

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley,  
Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler,  
Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjér, Wageningen  
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

*herausgegeben von den Professoren*

**E. Gäumann**  
Zürich

**M. Klinkowski**  
Aschersleben

**H. Richter**  
Berlin-Dahlem

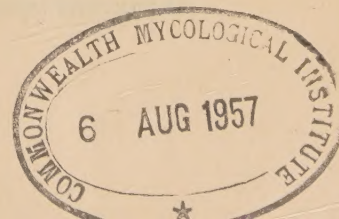


Mit 44 Abbildungen

1957

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 30 Heft 1 S. 1—116 Berlin 1957*



# INHALT

## Abhandlungen

BARTELS, R., Ein Beitrag zum serologischen Nachweis des Y-Virus in der Kartoffel. Mit 16 Abb. ....	1
BAZZIGHER, G., Über Anfälligkeit und Resistenz verschiedener Wirte von <i>Endothia parasitica</i> . Mit 6 Abb. ....	17
KERN, H., B. D. SANWAL, V. FLÜCK und D. KLUEFFEL, Die Verteilung der radio- aktiven Fusarinsäure in Tomatensprossen. Mit 4 Abb. ....	31
TERRIER, CH., Note sur <i>Uromyces acetosae</i> Schroeter et <i>Uromyces borealis</i> Liro ....	39
PERSSON, A., Über den Stoffwechsel und eine antibiotisch wirksame Substanz von <i>Polyporus annosus</i> Fr. Mit 16 Abb. ....	45
GÄUMANN, E., E. BACHMANN und R. HÜTTER, Über den Einfluß der Eisernährung auf die Lycopersamin-Empfindlichkeit der Tomatenpflanzen. Mit 2 Abb. ....	87
PICHLER, F., Physiologisch-chemische Untersuchungen mit Weizensteinbrandsporen. II. Atmung ....	106

## Kurze Mitteilung

GROSSE-BRAUCKMANN, E., Über den Einfluß der Kieselsäure auf den Mehлтаubefall von Getreide bei unterschiedlicher Stickstoffdüngung ....	112
--	-----

**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen“ sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen“ erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Herausgeber:** Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLIN-KOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen“ entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen“ unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen“ beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,— DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.



*Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,  
Institut für Virusserologie, Braunschweig*

## Ein Beitrag zum serologischen Nachweis des Y-Virus in der Kartoffel

Von

RUPRECHT BARTELS

*Mit 16 Abbildungen*

### Einleitung

Der serologische Nachweis des Kartoffel-Y-Virus ist ohne Schwierigkeiten im Saft Y-viruskranker Tabakpflanzen möglich. Weniger bekannt sind dagegen die Bedingungen, unter denen der Test an Y-viruskranken Kartoffeln gelingt. Diesbezügliche Veröffentlichungen beschränken sich meistens auf eine Beschreibung von Einzelfällen, bei denen positive oder negative Resultate erzielt worden sind.

Die erstmalige Herstellung von Y-Antisera gelang in der zweiten Hälfte der dreißiger Jahre und führte zwangsläufig zur diagnostischen Verwendung bei der Kartoffel. Die Ergebnisse zahlreicher Versuche aus diesen Jahren konnten jedoch nicht bestätigt werden, so daß sich eine nähere Beschäftigung mit ihnen erübrigt.

Im Jahre 1943 hat STAPP Reihenuntersuchungen an der latent mit Y-Virus verseuchten Sorte Frühe Hörnchen sowie an anderen Sorten mit wechselndem Erfolg durchgeführt. ROLAND berichtete 1945 über verschiedene Versuche mit Feldpflanzen, die trotz deutlicher Symptome serologisch nicht reagierten. Nur bei jungen, symptomlosen Gewächshauspflanzen gelang der Nachweis am Ende des Winters. Nach LIMASSET u. MONTGREMIEA (1947) war das Y-Virus in ausgewählten Pflanzen der Sorten Bintje und Ackersegen, die teilweise Symptome zeigten, während der Monate Juli und August serologisch zu erfassen. Die Autoren vertraten die Ansicht, daß das Auffinden von Y-viruskranken Stauden im Felde nicht nur von einem hinreichend qualitätvollen Serum, sondern auch von einem zeitlich genau festgelegten Prüfungstermin abhängig sei. Demgegenüber betonte ROZENDAAL (1949) in einem Referat über die Bedeutung der Serologie für die Saatkartoffelproduktion, daß noch keine für den Züchter praktische und leicht anwendbare Methode zum Nachweis des Y-Virus ausgearbeitet worden sei. 1950 hat VAN SLOGTEREN befriedigende Resultate mit einem Antiserumgemisch gegen X-, Y- und Aucuba-Virus im Agglutinationsverfahren mitgeteilt.

Erst in jüngerer Zeit finden sich in der ausländischen Literatur Hinweise über die Anwendung des serologischen Y-Virus-Testes bei Massenuntersuchungen. In Frankreich und Belgien (11, 17) wird die Präzipitinmethode neuerdings zur Auslese Y-viruskranker Kartoffelpflanzen benutzt, wobei die negativ reagierenden Säfte auf Testpflanzen abgerieben und diese nach geraumer Zeit ebenfalls serologisch geprüft werden. Im Winter versucht man, das Y-Virus auf dieselbe Art im Saft von Dunkelkeimen nachzuweisen. ---

Einer Bemerkung von ROZENDAAL (19) ist zu entnehmen, daß primärinfizierte Pflanzen mit Mosaiksymptomen serologisch stets positive Reaktionen ergeben, dagegen verläuft der Test bei Stauden mit nekrotischen Symptomen negativ. — BASILE hat 1955 auf Grund serologischer Prüfungen eine teilweise sehr starke Y-Virusverseuchung in italienischen Kartoffelsorten festgestellt, wobei die Autorin allerdings nicht auf die Sicherheit des Testes und die Nachweismöglichkeit in Verbindung mit dem Symptombild eingegangen ist.

Auch wir konnten in Vorversuchen feststellen, daß der Nachweis im Saft von Kartoffelblättern keineswegs in jedem Fall gelingt, und stellten uns daher die Aufgabe, die genauen Bedingungen des serologischen Testes auf Y-Virus, unter denen ein positives Resultat zu erwarten ist, näher zu bestimmen. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Methode für Untersuchungen in größerem Umfange eingesetzt werden kann und ob sie eine ausreichende Sicherheit besitzt.

### Methodik

Das verhältnismäßig einfache Verfahren des serologischen X-Virusnachweises ließ sich nicht ohne weiteres auf den Y-Virustest übertragen, weil das Y-Virus temperaturempfindlicher als das X-Virus ist, und außerdem in der Kartoffel in geringerer Konzentration als das letztgenannte Virus vorkommt. Aus diesem Grunde mußten im Untersuchungsgang möglichst alle Fehlerquellen, die die Viruskonzentration im Testsaft herabsetzen können, auf ein Minimum reduziert werden. So hat sich im Laufe der Prüfungen folgende Methodik ergeben:

Die Saftproben wurden nur aus den Fiedern ohne Blattstiel mit Hilfe von Preßzangen gewonnen. Wie Tastversuche gezeigt hatten, enthält die beim Quetschen der Blätter zuerst anfallende Flüssigkeit infolge des hohen Zellsaftanteils geringere Virusmengen als die nachfolgende; daher wurde die erste Fraktion in der Regel verworfen und erst der weitere Preßsaft unverdünnt für die Probe benutzt. Anschließend wurde zentrifugiert. Da das Bild

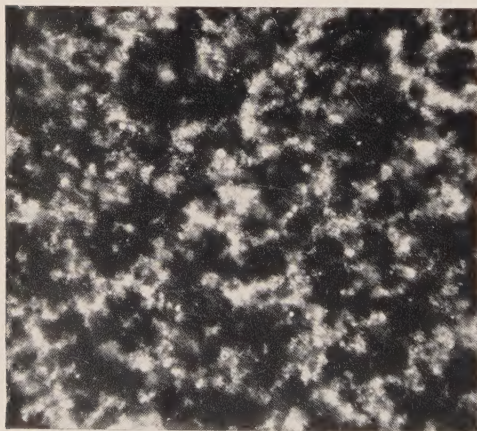


Abb. 1. Starkes Präzipitat im Preßsaft Y-viruskranker Kartoffelblätter; Vergr. 50fach

besonders das einer schwachen Reaktion — beim Bonitieren im Dunkelfeld durch Verunreinigungen erheblich gestört werden kann, mußten die Säfte restlos geklärt werden. Wir zentrifugierten mit gutem Erfolg bei 6000 U/min (5600 g) eine Stunde lang und achteten dabei auf ausreichende Kühlung (möglichst keine Erwärmung über 35 ° C). Kürzere Laufzeiten waren je nach Sorte und Alter der Pflanzen nur teilweise ausreichend. Die verhältnismäßig lange Laufzeit von einer Stunde verminderte die Viruskonzentration nicht. Da zentrifugierte Säfte älterer Blätter nach längerem



Stehenbleiben mitunter zu Spontanausflockungen neigten und infolgedessen im Test leicht zu unspezifischen Reaktionen führten, wurden die Proben nach dem Zentrifugieren möglichst ohne Unterbrechung nach der Tropfen-Methode auf dem Objektträger angesetzt und mindestens 40 Minuten lang bei 25 ° C im Brutschrank mit hoher Luftfeuchtigkeit belassen. Das Präzipitat des Y-Virus hatte im Kartoffelsaft das gleiche feinflockige Aussehen wie in Y-virushaltigem Tabaksaft (Abb. 1). Das Ablesen erfolgte im Dunkelfeld bei 50- bis 80facher Vergrößerung. Es wurden nur hochtitrige Antiseren in einer Verdünnung von 1 : 5 oder 1 : 10 verwendet, damit die bei Gebrauch von konzentriertem Serum häufig vorhandenen Mitreaktionen gegen gesundes Pflanzeneiweiß nicht mehr auftraten. Die Blättchenmethode (23) hatte sich in Vorversuchen als ungeeignet für den Y-Virustest erwiesen.

### Herstellung des Antiserums

Die zur Gewinnung von gereinigten Präparaten des Kartoffel-X-Virus von PFANKUCH und KAUSCHE (15) angegebene Methode wurde für die Reinigung des Y-Antigens in Verbindung mit dem Verfahren nach CREMER (5) modifiziert und ergab hochtitrige Antiseren (bis zu 1 : 32 000).

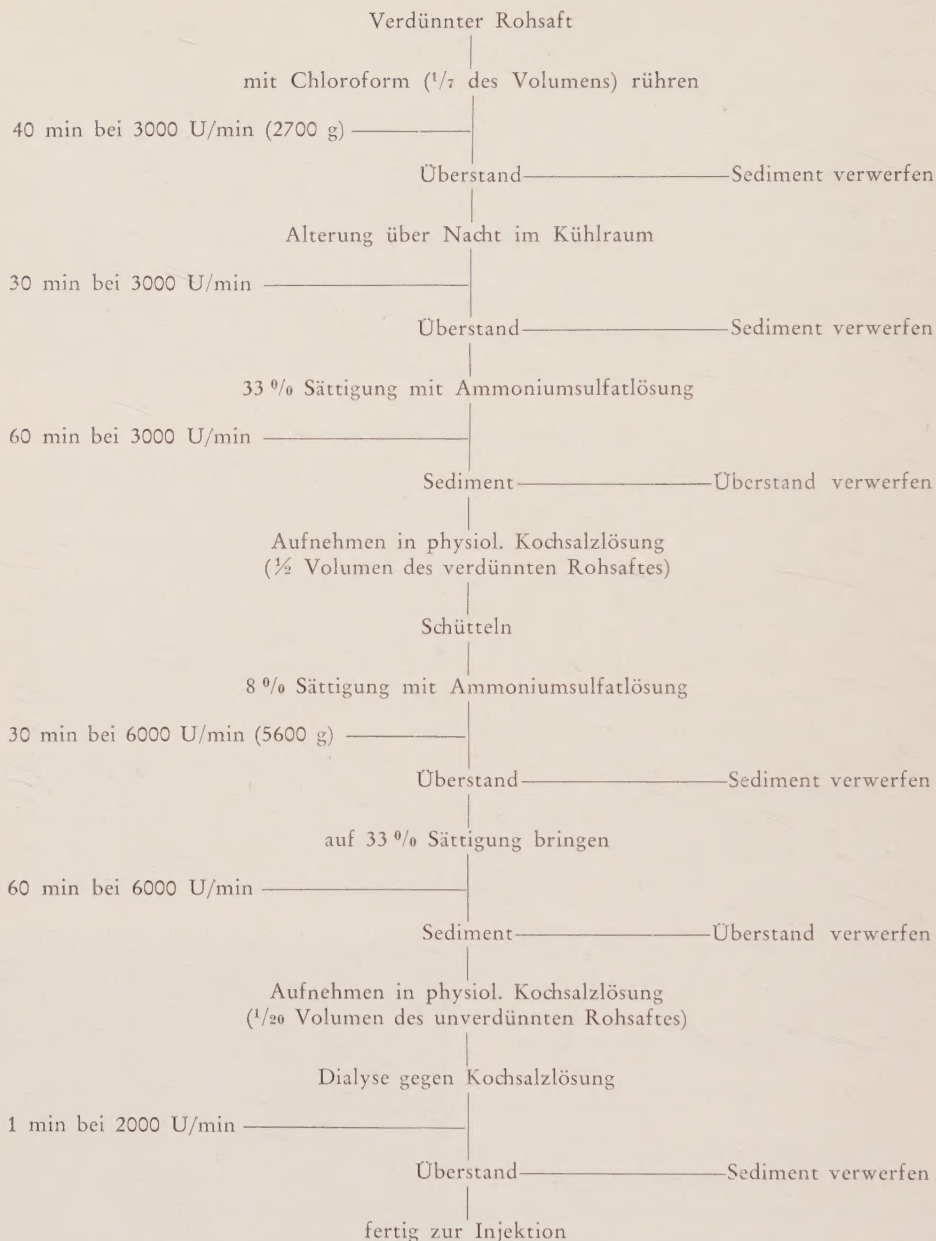
Eine größere Anzahl von Samsuntabakpflanzen wurde im Frühjahr oder Herbst mit einem Y-Virusstamm beimpft und etwa neun Wochen später geerntet. Ohne Mittelrippe wurden die Blätter im Homogenisator unter Zusatz von soviel Aqua dest. zerkleinert, daß der entstandene Blattrohsaft schließlich in einer Verdünnung von 1 : 3 vorlag. Anschließend wurde dieser Saft zur groben Reinigung durch ein Käsetuch filtriert. Um das temperaturempfindliche Y-Virus nicht zu schädigen, wurde eine zeitweilige Erwärmung während der Präparation möglichst ausgeschlossen und deshalb im Kühlraum bei + 4 ° C bzw. mit gekühlten Flüssigkeiten und Geräten gearbeitet. Die weiteren Arbeitsgänge sind dem nachfolgenden Schema zu entnehmen.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte an jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb von drei Wochen mit steigenden, in jeder Woche frisch zubereiteten Antigendosen; von der vierten Woche ab wurde das Blut zur Serumgewinnung entnommen.

### Versuchsmaterial und Ergebnisse

Das Untersuchungsmaterial bestand zunächst aus 24 virusfreien Zuchtstämmen und Sorten verschiedener Reifeklassen, die als Stecklinge im Frühjahr mit dem Preßsaft einer Y-viruskranken Ackersegen-Staude durch Abreiben im Gewächshaus beimpft worden waren; später wurden noch mehrere feldinfizierte Pflanzen einiger Sorten in die Prüfung einbezogen<sup>1)</sup>. Im Laufe der Vegetationsperiode wurden die sich bildenden Symptome verfolgt und gleichzeitig der serologische Nachweis erprobt. Dabei stellte sich heraus, daß das Virus-Isolat, das auf Ackersegen ein kräftiges Mosaik und Strichelsym-

<sup>1)</sup> Für die in großem Umfange bereitwilligst zur Verfügung gestellten Proben sei den Züchtern auch an dieser Stelle gedankt.



ptome gezeigt hatte, auf den verschiedenen Sorten bzw. Zuchtstämmen nicht nur gleiche oder ähnliche Symptome hervorrief, sondern *s ä m t l i c h e* für einzelne Virusstämmen bereits beschriebene Krankheitsbilder und zwar in unterschiedlicher Stärke erzeugte. Seit den Untersuchungen von BAWDEN und KASSANIS (2) ist bekannt, daß die Y-Virus-Stämme über eine ebenso



unterschiedliche Virulenz verfügen wie X-Virusstämme, daß aber der relative Virulenzgrad eines Stammes für alle Sorten (mit einer Ausnahme) gilt. Obwohl sich das Ackersegen-Isolat aller Wahrscheinlichkeit nach aus mehreren Stämmen zusammensetzte, war es für uns überraschend, nach der Infektion mit einem einzigen Virus-Isolat diese Vielfalt der Krankheitsercheinungen zu beobachten.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen lassen sich die einzelnen Sorten je nach Reaktionstyp in drei Gruppen einteilen, die zugleich eine Aussage über ihr Verhalten bei der serologischen Prüfung gestatten. Hierfür seien im folgenden einige Beispiele aufgeführt.

### 1. Gruppe: Nekrotischer Reaktionstyp

Auf den Blättern der in diese Gruppe einzureihenden Sorten erschienen dunkelbraune bis schwarze, teilweise etwas eingesunkene Flecke von einem bis zu mehreren Millimetern Durchmesser (Tintenspritzer), die häufig auf die Blattadern übergriffen und dort das bekannte Bild der „Strichelkrankheit“ erzeugten. Wie Abbildung 2 zeigt, starben bei einer Anhäufung derartiger Nekrosen größere Blattpartien oder sogar ganze Blattfiedern ab. Ein anderer Sortentyp reagierte mit starken Nekrosen und Krüppelwuchs (Abb. 3). Ebenfalls dieser Gruppe zuzuordnen war ein Zuchtstamm, der neben vollständig gesund erscheinenden Blättern vereinzelt Blätter mit nur wenigen nekrotischen Flecken und an den Adern verlaufenden Stricheln ausbildete (Abb. 4); weitere Sorten zeigten das für eine Y-Virusinfektion typische Absterben mittlerer und unterer Blätter, wie es Abbildung 5 wiedergibt; und schließlich war ein starkes Kräuselmosaik mit kräftigem Strichelmuster auf der Blattunterseite zu beobachten (Abb. 6), eine Erscheinung, die leicht als Mischinfektion gedeutet werden könnte. Ein in solchen Fällen durchgeführter Tabaktest hat jedoch stets ergeben, daß diese Blattmißbildung allein durch das Y-Virus verursacht worden war. Die beiden letzten Krankheitsbilder (Abb. 5 u. 6) traten übrigens an primärinfizierten Pflanzen ebenso



Abb. 2. Starke Fleck- und Strichelnekrosen sowie teilweise abgestorbene Blattfiedern als Folge einer Primärinfektion mit einem Y-Virusisolat bei einem Kartoffelzuchtstamm (Gruppe 1)



Abb. 3. Nekrotische Flecke, Strichel und Krüppelwuchs als Primärsymptome bei einem weiteren Zuchtstamm (Gruppe 1)

ausgeprägt in Erscheinung wie an sekundärinfizierten. — Das für alle in diese Gruppe einzustufende Sorten bzw. Zuchtstämme gemeinsame Merkmal war das mehr oder weniger starke Auftreten von Nekrosen.

Versuche, das Virus im Preßsaft dieser Pflanzen auf serologischem Wege nachzuweisen, schlugen in den meisten Fällen fehl. Sowohl Blätter mit zahlreichen (Abb. 2) oder vereinzelt nekrotischen Flecken und Stricheln als auch symptomlose Blätter teilweise geschädigter Stauden (Abb. 4) gaben nur zu 2 % serologisch positive Reaktionen, so daß mit dieser Methode an solchen Pflanzen kein Virusnachweis geführt

werden kann. Gelegentlich kam es bei den Prüfungen dieser Gruppe zu unspezifischen Ausflockungen.

## 2. Gruppe: Mosaik/Strichel-Reaktionstyp

Der Hauptanteil der geprüften Sorten antwortete auf die Infektion mit einem deutlichen Mosaik (Abb. 7), das vielfach mit einer Blattaufrauhung (Abb. 8) oder auch mit einer kräftigen Aufwölbung der Interkostalfelder einherging; Strichel- bzw. Flecknekrosen-Ausbildung trat gelegentlich auf, beschränkte sich aber meistens auf die unteren bis mittleren Blätter und nahm kaum größeren Umfang an. Mehr oder minder stark ausgeprägt war der Blattfall, einige Sorten zeigten das Symptom der Himbeerblättrigkeit. Bei einem Zuchtstamm fanden wir an den oberen Blättern sekundärinfizierter Stauden verwaschene, unregelmäßig über die Spreite verteilte gelbe Flecke (Abb. 9). Sie sahen den Aufhellungen an bukettviruskranken Kartoffeln recht ähnlich, wie sie von GEHRING u. BERCKS (7) als Vorläufer von Ringnekrosen beobachtet wurden. In den unteren Blättern ging dieses Krankheitsbild in schwarze nekrotische Flecke über, die das Blatt vorzeitig vergilben ließen und zum Blattfall führten.

Ein wesentliches Kennzeichen der in Gruppe 2 eingeordneten Sorten war die Mosaikausbildung in den oberen Blättern, während in den darunter



befindlichen Bereichen Übergänge zu schwereren Krankheitsformen, und an den untersten Blättern, soweit sie nicht vorzeitig vergilbt und vertrocknet waren, ausgeprägte Nekrosen auftraten.



Abb. 4. Zuchtstamm mit einzelnen durch Nekrosen geschädigten, in der Mehrzahl jedoch gesund erscheinenden Blättern (Gruppe 1)

Als Beispiel für das Ergebnis der serologischen Untersuchung dieser Gruppe ist die Analyse eines etwa 15 Wochen alten Stecklings ausgewählt und in Tabelle 1 zusammengestellt worden. Nur bei Blättern mit Himbeerblättrigkeit oder Mosaiksymptomen war eine serologisch positive Reaktion zu verzeichnen, bei stärker geschädigten Blättern fiel der Test negativ aus. Die oberen, nicht ausgewachsenen Blätter mußten zu einer Probe zusammengefaßt werden und enthielten erfahrungsgemäß zu geringe Virusmengen, als daß bei ihnen der serologische Nachweis positiv hätte verlaufen können. Bei anderen Vertretern dieser Gruppe, die in den oberen und mittleren Blattetagen ein kräftiges Mosaik ohne nekrotische Flecke (Abb. 7) und im unteren Stengelabschnitt Blattfall zeigten, gelang der Nachweis in überwiegender Mehrzahl der Fälle. Gleichfalls positive Resultate erhielten wir bei Rauhblattmosaik (Abb. 8) in diesen Blattetagen oder bei Himbeerblättrigkeit mit vereinzelt Stricheln. Der Anteil der unspezifischen Reaktionen betrug etwa 10 %.

Tabelle 2 gibt das Gelingen des Nachweises bei neun Sorten bzw. Zuchtstämmen, die mit dem Ackersegen-Isolat infiziert wurden, wieder; sie läßt durch die breite Spanne der Prozentzahlen von 21 bis 83 deutlich werden, daß die Sicherheit des Testes mit steigender Schädigung der Pflanze (Nekrosen) abnimmt. Den gleichen Schluß konnten wir aus dem Verhalten verschiedener Pflanzen derselben Sorte ziehen, die auf die Infektion nicht immer gleichartig reagierten, sondern in einem Falle nur ein kräftiges Mosaik, im anderen Mosaik mit Nekrosen zeigten. Ferner lassen die unter H und J aufgeführten Beispiele erkennen, daß zwischen Gruppe 1 und 2 keine scharfe Grenze zu ziehen ist, sondern Übergangstypen vorhanden sind. Und schließlich geht aus der Zusammenstellung hervor, daß der serologische Nachweis nicht vom Virusstamm bzw. -isolat allein abhängt.



Abb. 5. (links) Das im allgemeinen für eine Y-Virusinfektion typische Krankheitsbild mit abgestorbenen, am Stengel herabhängenden Blättern bei einem sekundär infizierten Zuchtstamm (Gruppe 1)

Abb. 6. (rechts) Starkes Kräuselmosaik bei einem weiteren Zuchtstamm (Gruppe 1)

### 3. Gruppe: Latenter bzw. Mosaik-Reaktionstyp

Aus der Reihe der geprüften Sorten ließen sich nur wenige in die letzte Gruppe einordnen; ihr gemeinsames Merkmal war ein mehr oder minder schwaches Mosaik, wie es oft bei einer X-Virusinfektion im Felde auftritt. Im Gegensatz zum Mosaik der zweiten Gruppe war dieses Symptom nicht von einer Aufwölbung der Interkostalen begleitet, sondern beschränkte sich auf eine verwaschene Verfärbung der Fiedern ohne Deformationen (Abb. 10). Unter bestimmten Umweltbedingungen konnten diese Erscheinungen sogar völlig verschwinden, so daß die Infektion maskiert blieb (Abb. 11).

Ferner gehörten zur Gruppe 3 mehrere Kartoffelsorten, die die Infektion mit einem in Deutschland neu auftretenden Y-Virusstamm größtenteils gar nicht oder nur in geringem Maße anzeigen. Dieser Stamm unterscheidet sich von den gewöhnlichen Stämmen des Y-Virus in erster Linie durch sein Verhalten auf Tabak, und zwar ruft er dort eine kräftige Adernnekrose und Epinastie der Folgeblätter (ohne das sonst übliche Perlmuster) hervor. Er



Tabelle 1

Analyse eines Stecklings (späte Sorte), gepflanzt am 10. Mai 1955;  
Y-Virus-Infektion am 10. Juni 1955; Untersuchung am 20. August 1955

Lfd. Blatt-Nr.	Symptome	serologischer Test
1	Blatt abgefallen .....	
2	Blatt abgefallen .....	
3	keine .....	0
4	nekrotische Flecke .....	0
5	keine .....	0
6	nekrotische Flecke, Strichel .....	0
7	nekrotische Flecke, Strichel .....	unspezifisch
8	nekrotische Flecke, Strichel .....	0
9	nekrotische Flecke, Strichel .....	0
10	nekrotische Flecke, Strichel .....	0
11	starke Vergilbung .....	nicht geprüft
12	nekrotische Flecke, Strichel .....	0
13	starke Vergilbung .....	nicht geprüft
14	starkes Mosaik .....	+
15	Himbeerblättrigkeit .....	unspezifisch
16	Himbeerblättrigkeit .....	+
17	Himbeerblättrigkeit .....	+
18	Himbeerblättrigkeit, gewellter Blattrand .....	+
19	Himbeerblättrigkeit, gewellter Blattrand .....	+
20	Himbeerblättrigkeit, gewellter Blattrand .....	0
21	Himbeerblättrigkeit, gewellter Blattrand .....	0
Spitze	Himbeerblättrigkeit, gewellter Blattrand .....	0

wurde bisher aus Freilandkulturen von Tomaten (BARTELS, 1953, unveröffentlicht), Tabak und Kartoffeln isoliert und ist von verschiedenen Autoren verschieden benannt worden. Weitere Einzelheiten sind der Besprechung zu entnehmen.

Seine auf den untersuchten Feldpflanzen und Augenstecklingen nur zeitweilig sichtbaren Symptome beschränkten sich gegenüber gesunden Pflanzen auf geringfügige Veränderungen, wie aus den Abbildungen 12 bis 15 (aufgenommen Anfang Juli 1956) mit gesunden und kranken Trieben von Feldpflanzen zweier Sorten hervor-



Abb. 7. Starke Mosaikfleckung und Aufwölbung der Interkostalfelder bei dem oberen Blatt einer früh bis mittelfrühen Sorte (Gruppe 2)

Tabelle 2

Die Möglichkeit des serologischen Nachweises in Abhängigkeit von der Schädigung der Pflanze  
(Weitere Erklärung im Text)

Sorte bzw. Zuchtstamm	Symptome	Serologisch positiv reagierende Blätter je Probenanzahl
A	Rauhblattmosaik .....	30/36 = 83 %
B	starkes Mosaik .....	20/24 = 83 %
C	Himbeerblättrigkeit, wenige Strichel ..	23/29 = 80 %
D	starkes Mosaik, wenige Strichel .....	14/19 = 74 %
E	sehr starkes Mosaik, wenige Strichel ....	34/46 = 74 %
F	vorwiegend Kräuselmosaik .....	28/40 = 70 %
G	sehr starkes Mosaik .....	36/70 = 51 %
H	Flecknekrosen, Strichel, Mosaik .....	61/134 = 46 %
J	Flecknekrosen, Rauhblatt .....	8/38 = 21 %

geht. Neben einer schwach glänzenden, rauen Blattoberfläche (Bronzetyp) zeigten die Fiedern eine leichte Auffaltung längs der Mittelrippe und einen mäßig gewellten Blattrand, insgesamt also Eigenschaften, die durchaus sortentypisch sein können (vgl. Abb. 14 u. 15). Gelegentlich waren die kranken Pflanzen etwas heller gefärbt als die gesunden oder auch umgekehrt (vgl.



Abb. 8. Rauhmosaik an dem oberen Blatt einer mittelspät bis späten, als Y-virusanfällig bekannten Sorte (Gruppe 2)

Abb. 12, 13 u. 16). An Gewächshausstecklingen trat mitunter ein schwaches Mosaik auf, das aber wieder verschwinden konnte; manchmal vergilbten die unteren Blätter vorzeitig, und einige Male wurden sogar Nekrosen an ihnen beobachtet. Diese Symptome waren in den meisten Fällen nur an wenigen Pflanzen sichtbar, in der Mehrzahl blieb die Infektion maskiert (Abb. 16). Daher gestaltet sich eine sichere Diagnose auf Grund des Erscheinungsbildes äußerst schwierig.

Der serologische Nachweis war bei dieser Gruppe mit gleicher Sicherheit wie beim X-Virus möglich, vorausgesetzt, daß weder zu alte, noch zu junge Blätter für die Probe ausgewählt wurden. Am besten eignen sich ausgewachsene Blätter unterhalb der Sproßspitze. Die Prüfung von sekundärinfizier-



ten Feldpflanzen einer mittelfrühen Sorte ließ sich unter hiesigen Bedingungen ohne Schwierigkeiten von der fünften Woche ab nach dem Auslegen durchführen; die Größe der Stauden betrug 12 bis 15 cm. An Gewächshauspflanzen gelang der Test im Frühjahr bereits in der vierten Woche nach dem Auslegen. Bei Stecklingen im Winter konnte die Untersuchung erst an sechs Wochen alten Pflanzen vorgenommen werden, weil jüngere Stecklinge noch nicht hinreichend vom Virus durchsetzt waren und dadurch die Sicherheit des Testes verringert war. Ältere Gewächshaus- und Freilandpflanzen (12 Wochen alt und mehr) ließen sich in den oberen Blattetagen oft bis zum Eintritt der Gelbreife mit Erfolg prüfen; Einzelheiten darüber werden später in anderem Zusammenhang mitgeteilt werden.

Um beurteilen zu können, wie hoch die Sicherheit des Testes bei der Gruppe 3 ist, wurde eine größere Probenanzahl nicht nur serologisch, sondern zusätzlich durch Abreibung auf Tabak untersucht.

Von über 1000 Augenstecklingen mit Verdacht auf maskiertes Y-Virus, die zu einem Drittel serologisch positiv reagiert hatten, wurden 413 serologisch negative Proben auf jeweils einer Samsun-Pflanze unter Verwendung von Karborund abgerieben. Etwa drei Wochen später konnten hiervon sieben Pflanzen auf Grund der Nervennekrose als krank bonitiert werden; das Ergebnis wurde durch



Abb. 9. Oberes Blatt eines sekundärkranken Zuchtstammes mit verwaschenen gelben Flecken, die als eine Art Vorstufe späterer schwerer Nekrosen anzusehen sind (Gruppe 2)



Abb. 10. Schwaches Mosaik bei einer mittelfrühen Sorte (Gruppe 3)



Abb. 11. Maskierte Y-Virusinfektion bei einer mittelfrühen Sorte (Gruppe 3)

eine serologische Prüfung sämtlicher Testpflanzen gesichert.

Infolgedessen ist die Unsicherheitsquote in der Gruppe 3 auf etwa 2 % anzusetzen und liegt damit durchaus im Toleranzbereich biologischer Prüfungsverfahren. — Im übrigen sei noch bemerkt, daß auch der Tabaktest nicht fehlerfrei anzeigte; denn unter sieben serologisch positiven, zur Kontrolle auf Tabak abgeriebenen Proben riefen zwei keine Symptome hervor.

### Besprechung

Der neue, im letzten Abschnitt besprochene Y-Virusstamm, der sich mit unserem gegen einen Normalstamm hergestellten Antiserum ohne Schwierigkeiten nachweisen ließ, steht mit großer Wahrscheinlichkeit in enger ver-

wandtschaftlicher Beziehung zu den in Deutschland innerhalb der letzten Jahre isolierten Varianten (4, 9), die sich nach der neuesten Untersuchung (8) in ihrer Virulenz teilweise unterscheiden. Da er nach Abreibung auf Tabak ein ähnliches Verhalten gezeigt hat wie die von NOBREGA und SILBERSCHMIDT (14) und von BAWDEN und KASSANIS (3) vor mehreren Jahren beschriebenen Isolierungen, ist eine nahe Verwandtschaft mit ihnen nicht ausgeschlossen; von KÖHLER (9) wird sogar die Möglichkeit einer Identität angenommen. Da derartige Überlegungen vorwiegend auf symptomatologischen Ergebnissen basieren, deren Wert als brauchbares Kriterium nicht allzu hoch veranschlagt werden darf, haben wir serologische Untersuchungen aufgenommen, die in Kürze in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden.

Wie schon erwähnt, tritt der neue Stamm nach unseren bisherigen Erfahrungen im Gegensatz zu den Normalstämmen vorwiegend mehr oder weniger maskiert auf. Es sind jedoch 1956/57 einzelne Fälle beobachtet worden, in denen er schwerste Verkrüppelungen an sekundärkranken Stecklingen hervorgerufen hat, so daß er sich auf der Kartoffel symptomatologisch von den gewöhnlichen Stämmen nicht unterschied. Es bleibt abzuwarten, ob er seine Latenz auf Kartoffeln im großen und ganzen beibehalten wird oder ob sich sein symptomatologisches Verhalten im Laufe der Zeit den Normalstämmen angleicht und er damit ähnliche Reaktionen wie das potato veinal necrosis Virus von K. SMITH (21) auslöst.



Abb. 12.  
Gesunder  
Trieb einer  
mittelfrühen  
Sorte  
(Feldpflanze)



Abb. 13.  
Kranker  
Trieb der-  
selben Sorte  
wie in  
Abb. 12,  
infiziert mit  
dem auf  
Tabak  
nekrotischen  
Y-Virus-  
stamm  
(Gruppe 3)



Die zuletzt erwähnten Beobachtungen stellen übrigens eine Parallele zu den Ergebnissen unserer Infektionsversuche mit dem Ackersegen-Isolat dar, weil wir dort ebenfalls extrem unterschiedliche Symptomausprägung — schwerstes Kräuselmosaik und Nekrosen einerseits und Maskierung andererseits — gefunden haben. Nur hat das Ackersegen-Isolat die verschiedenen Bilder auf v e r s c h i e d e n e n Sorten hervorgerufen, während das ungewöhnliche Verhalten des neuen Stammes bisher an einer e i n z i g e n Sorte bemerkt wurde. Die bereits angeführten Infektionsversuche von BAWDEN und KASSANIS (2) und ähnliche Untersuchungen von DARBY u. a. (6) haben ein insgesamt nicht so breites Symptom-Spektrum ergeben; das ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf andersartige Virusstämme bzw. -isolate und auf den unterschiedlichen Reaktionsgrad der verwendeten Kartoffelsorten zurückzuführen. Auch dürfte eine spezifische Wirkung der Wirtspflanze auf das Virusisolat, das als Gemisch von Stämmen aufzufassen ist, nicht ausgeschlossen sein, indem einzelne oder mehrere Komponenten der Mischung in einer bestimmten Sorte bevorzugt vermehrt werden. Eine derart „natürliche Selektion“ wird stets von zahlreichen inneren und äußeren Faktoren



Abb. 14. Gesunder Trieb einer späten  
Sorte (Feldpflanze)



Abb. 15. Kranker Trieb derselben Sorte  
wie in Abb. 14, infiziert mit dem auf  
Tabak nekrotischen Y-Virusstamm  
(Gruppe 3)



Abb. 16. Blätter von Gewächshaus-Stecklingen einer mittelfrühen Sorte  
(dieselbe wie in den Abb. 12 u. 13); links gesund, rechts Y-viruskrank  
(Gruppe 3)



abhängig sein, so daß schon aus diesem Grunde kaum mit einer Konstanz des Symptombildes zu rechnen ist. Außerdem ist in diese Überlegung noch die Veränderung eines Stammes durch Mutation einzubeziehen, wie sie sich vielleicht in unserem Falle der Nekrosenbildung nach vorausgegangener Maskierung ereignet hat.

Der serologische Nachweis des Y-Virus ist, wie die im vorhergehenden Kapitel besprochenen Beispiele zeigen, in der Kartoffel grundsätzlich möglich, allerdings ist seine Genauigkeit unterschiedlich und von der jeweils vorliegenden Viruskonzentration abhängig, die ihrerseits mit dem Symptombild eng verknüpft ist. Bei einer maskierten Infektion enthält die Pflanze derart beträchtliche Virusmengen, daß der Test zu Beginn und in der Mitte der Vegetationsperiode nicht nur mit dem Preßsaft eines jeden ausgewachsenen Blattes gelingt, sondern sich sogar zu quantitativen Bestimmungen verwenden läßt. Äußert sich aber die Erkrankung in nekrotischen Symptomen, so ist die Genauigkeit des Testes in Frage gestellt, weil die Viruskonzentration in solchen Pflanzen erheblich geringer ist als in toleranten Sorten. Bei hochresistenten Sorten kann nach unserer Erfahrung der äußerlich sichtbare Befall, der im ersten Jahre meistens zu sehr starken Flecknekrosen führt, schon im zweiten Jahre derart stark zurückgehen, daß manche Blätter völlig symptomfrei bleiben. Im Gegensatz zu der bei Gruppe 3 beschriebenen Maskierung wird diese Form der Latenz kaum zu einem sicheren serologischen Nachweis führen, weil die Viruskonzentration auf Grund einer Resistenz der Pflanze sehr gering ist.

### Zusammenfassung

Durch wiederholte serologische Prüfungen auf Kartoffel-Y-Virus, die an zahlreichen feld- und künstlich infizierten Kartoffelsorten und Zuchtstämmen durchgeführt wurden, konnten die Voraussetzungen ermittelt werden, unter denen bei Einhaltung bestimmter methodischer Bedingungen ein positiver Ausfall der serologischen Reaktionen zu erwarten ist.

Es hat sich herausgestellt, daß die Nachweismöglichkeit weder vom Virusstamm, noch von der Kartoffelsorte, sondern von der Kombination Virus/Sorte abhängt und eng verknüpft mit dem Symptombild ist.

Je nach Virulenz des Virusstammes (oder -isolates) und der Resistenz oder Toleranz der Sorte antwortete die Pflanze auf die Y-Virusinfektion mit kräftigen Fleck- und Strichelnekrosen (1. Reaktionstyp), mit deutlichen Mosaik- und vereinzelt Strichelsymptomen (2. Reaktionstyp) oder mit schwachem Mosaik bzw. maskiertem Befall (3. Reaktionstyp).

Der serologische Nachweis ließ sich bei Gruppe 1 nur gelegentlich durchführen; bei Gruppe 2 gelang er je nach Schädigung der Pflanzen bis zu etwa 80 %, so daß er hier zur Differentialdiagnose herangezogen werden konnte; bei Gruppe 3 war die Nachweismöglichkeit ebenso groß wie beim Test auf X-Virus. Die Unsicherheitsquote betrug ungefähr 2 %.

Die Herstellung der verwendeten Y-Antisera wird beschrieben.

## Literaturverzeichnis

1. BASILE, R., 1955: Diagnosi precoce di virosi in alcune varietà di patate italiane. Boll. Staz. Patalog. Veget. Roma **12**, 213—219.
2. BAWDEN, F. C., and B. KASSANIS, 1947: The behaviour of some naturally occurring strains of potato virus Y. Ann. Appl. Biol. **34**, 503—516.
3. — —, and — —, 1951: Serological related strains of potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants. Ann. Appl. Biol. **38**, 402—410.
4. BODE, O., und H. L. PAUL, 1956: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. III. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. Phytopath. Z. **27**, 107—112.
5. CREMER, M. C., 1952: The preparation of antiserum against potato virus Y. Proc. 1st Conf. Potato Virus Diseases, Wageningen, 85—87.
6. DARBY, J. F., R. H. LARSON and J. C. WALKER, 1951: Variation in virulence and properties of potato virus Y strains. Res. Bull. Uni. Wisconsin, Madison **177**, 1—32.
7. GEHRING, F., und R. BERCKS, 1956: Untersuchungen über das Bukett- und Pseudo-Aucuba-Virus der Kartoffel. Phytopath. Z. **27**, 215—234.
8. KLINKOWSKI, M., und K. SCHMELZER, 1957: Beiträge zur Kenntnis des Virus der Tabak-Rippenbräune. Phytopath. Z. **28**, 285—306.
9. KÖHLER, E., 1955: Weitere Beiträge zur Kenntnis des Y-Virus der Kartoffel. Phytopath. Z. **23**, 328—334.
10. — —, und K. HEINZE, 1939: Zur Methodik der vergleichenden Sortenprüfungen auf Y-Virus-Resistenz bei Kartoffeln. Züchter **11**, 169—174.
11. LIMASSET, P., 1955: L'identification sérologique des virus des plantes. Revue Pathologie Génér. et Comparée **55**, No. 667, 609—625.
12. — —, et H. DE MONTGREMIER, 1947: La microméthode serologique pour l'étude des viroses végétales. Ann. Epiphyt. **13**, 173—185.
13. MARCUS, O., 1953: Über die Y-Virus-Verseuchung der Knollen primär infizierter Kartoffelpflanzen. Phytopath. Z. **20**, 121—132.
14. NOBREGA, N. R., and K. SILBERSCHMIDT, 1944: On a suspected variant of the potato virus „Y“ (Solanum Virus 2, Orton) which causes necrosis on tobacco plants (portugies.). Arquivos Inst. Biol., S. Paulo **15**, 307—330.
15. PFANKUCH, E., und G. A. KAUSCHE, 1938: Über Darstellung, Eigenschaften und quantitative Bestimmung von Tabakmosaikvirus und Kartoffel-X-Virus und ihre physikochemische Differenzierung. Biochem. Z. **299**, 334—345.
16. ROLAND, G., 1945: Sur une microméthode sérologique pour l'étude des viroses végétales. Parasitica **1**, 106—112.
17. — —, 1952: Identification des virus de la pomme de terre. Proc. 1st Conf. Potato Virus Diseases, Wageningen 31—33.
18. ROZENDAAL, A., 1949: Die Bedeutung der Serologie für die Saatkartoffelproduktion. Landwirtsch. Vorträge, Heft 16: Neuere Forschungen über Pflanzenschutz und Viruskrankheiten, 12—22. Verlag Huber & Co., Frauenfeld (Schweiz).
19. — —, 1955: Diskussionsbemerkung in Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, p. 110.
20. VAN SLOGTEREN, E., 1950: Serologie ten dienste van het virusonderzoek bij planten. Meded. Dir. Tuinb. **13**, 688—702.
21. SMITH, K. M., 1957: A textbook of plant virus diseases, p. 398. J. & A. Churchill Ltd., London.
22. STAPP, C., 1943: Die serologische Virusdiagnose und ihre Bedeutung für den Kartoffelbau. Mitt. Biol. Reichsanstalt, Berlin-Dahlem, Heft 67, 6—30.
23. — —, und R. BERCKS, 1949: Über weitere Antrocknungsversuche mit Serum gegen Kartoffelviren. Phytopath. Z. **15**, 47—53.



## Über Anfälligkeit und Resistenz verschiedener Wirte von *Endothia parasitica*

Von

G. BAZZIGHER

Mit 6 Abbildungen

Inhalt: A. Einleitung. — B. Histologische Reaktionen auf den *Endothia*-Befall. 1. Methodik; 2. Kallusbildung; 3. Thyllenbildung als Reaktion auf den Befall durch *Endothia parasitica*; 4. Die Bildung von Korkbarrieren. — C. Wuchsstoffe und Resistenz. — D. Die experimentelle Beeinflussbarkeit der Resistenz. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

### A. Einleitung

Die Resistenz diverser Kastanienarten gegenüber *Endothia parasitica* (Murr.) And. wurde verschiedentlich zu erklären versucht. Die Hypothese, daß Tanninen und Phenole eine Bedeutung als Resistenzfaktoren zukommt, ist heute nicht mehr haltbar, denn es konnten *in vitro* und *in vivo* *Endothia*-Fermente nachgewiesen werden, welche diese Gerbstoffe vollständig abbauen (BAZZIGHER, 1955). Dieser Abbau *in vivo* ist in über 100 Proben festgestellt worden. Überall, wo diese wahrscheinlich bei sehr vielen Pilzen vorkommenden Fermente [mutmaßlich Tannase oder eine ähnlich wirkende Esterase und die Pyrogallase (BAZZIGHER, 1957)] im Wirtsgewebe wirken können, ist es ausgeschlossen, daß Tannine, Gallussäure und verschiedene Phenole als Resistenzfaktoren eine Bedeutung haben. Die Grundlagen der Resistenz müssen anderswo gesucht werden.

Die Publikation von BIRRAGHI (1951) „Caratteri di resistenza in *Castanea sativa* nei confronti di *Endothia parasitica*“ berichtet über die bisher noch unbekannte Form von „Resistenzverschiebung“. Stockausschläge von ehemals schwer erkrankten Kastanienbäumen zeigen nach seinen Beobachtungen eine erhöhte Resistenz gegen *Endothia parasitica*. Sie vermögen zum großen Teil den Pilz zurückzudämmen, und in vielen Fällen gesunden die Pflanzen. Nach BIRRAGHI ist diese verminderte Anfälligkeit durch die Bildung von Korkbarrieren, die das Vordringen des Pilzes bis zum Kambium verhindern, zu erklären. Diese postinfektionell entstandenen Schutzgewebe sind die Folge

eigentlicher Abwehrreaktionen (Definition von Immunität, Resistenz, Abwehrreaktionen usw., siehe GÄUMANN, 1951). Möglicherweise spielen hier sowohl antiparasitische als auch antitoxische Abwehrreaktionen mit. Diese erhöhte Reaktionsfähigkeit der Stockausschläge ist bis heute meines Wissens nicht eindeutig erklärbar. Vorliegende Arbeit, die als Beitrag zur Kenntnis der Anfälligkeit und Resistenz von *Endothia*-Wirten gedacht ist, soll auch zu diesem Problem einige Hinweise geben.

## B. Histologische Reaktionen auf den *Endothia*-Befall

### 1. Methodik

Die folgende Infektionsmethode wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. F. FISCHER und Herrn F. RITTER von der Eidgenössischen Anstalt für das forstliche Versuchswesen entwickelt und hat sich für unsere Arbeiten sehr gut bewährt.

Die Pflanzen werden mit einem speziellen korkbohrerähnlichen Instrument so angeschnitten, daß die Verwundung bis auf das Kambium reicht, so daß die Rindenpartie sich gut löst. Es wird immer mit derselben Korkbohrergröße gearbeitet ( $\phi = 0,5$  cm). Für die Infektion hat sich das Pfropfen von frischen *Endothia*-kranken Rindenstücken aus jungen (etwa einjährigen) Läsionen, die mit dem gleichen Korkbohrer ausgestanzt wurden, bewährt. Der Pilz weist viel weniger Schwankungen der Virulenz und der Pathogenität auf, als bei Kulturen in vitro. Die Rindenstücke werden mit der Myzelseite aufs Kambium gelegt, und die ganze Infektionsstelle wird möglichst dicht mit Cellophan-Selbstklebeband umwickelt. Die ersten Infektionen werden im Frühjahr während des Austreibens der Bäume durchgeführt. Der Infektionserfolg bei etwa 10 000 infizierten *Castanea sativa* (Resistenzprüfung und Selektion) war etwa 90—95 % (4 bis 9 % sind Fehlresultate, die auf unrichtiger Durchführung der Infektionen oder auf anderen Zufälligkeiten beruhen, und 1 % sind mutmaßlich resistendere Prüflinge). Eine Überprüfung der Infektionen zeigt schon nach 1 Monat meßbare Läsionen. Für die Beurteilung der Abwehrreaktionen wurden verschieden alte Läsionen untersucht. Frisch gesammelte Proben wurden mit Navashin-Lösung fixiert, in der Alkoholreihe nach KISSER (1932) und JOHANSEN (1940) (siehe HESS, 1951) entwässert und in Paraffin übergeführt. Die Färbung mit Baumwollblau (Methylwasserblau) (nach BAVENDAMM, 1936) gestattet das Erkennen des Pilzes im Wirtsgewebe. Der Nachweis von Zellulose, Lignin und Suberin wurde mit verschiedenen bekannten spezifischen und kombinierten Färbungen erreicht. Ferner verwendeten wir zur Beurteilung auch die Fluoreszenzmikroskopie.

### 2. Kallusbildung

Wohl die auffälligste Reaktion der Wirtsgewebe auf den *Endothia*-befall ist die starke, häufig aber durchaus nicht immer zu beobachtende Hyper-



trophie der Rindengewebe. Diese ist, wie schon BRAMBLE (1936) feststellte, an jüngeren Ästen häufiger als an älteren Baumpartien. Auf Grund dieser Anschwellungen der Rindengewebe wurde die Krankheit Kastanienrindenkrebs genannt. Die Gewebewucherungen, zur Hauptsache Kallusbildungen, und zwar im wesentlichen Rinden- und Kambialkallus, sind verschieden stark ausgebildet, und man kann (auch innerhalb eines Wirtsindividuum) extreme Atrophie und Hypertrophie finden. Atrophie entsteht durch vollständiges Aussetzen der Kallusbildung. Diese schwankt mit den herrschenden äußeren Bedingungen und dem Ernährungszustande des Versuchsobjektes innerhalb sehr weiter Grenzen (KÜSTER, 1925). Wie schon früher gezeigt wurde, kann der Kallus im allgemeinen das pathogene Agens nicht abriegeln. Dies ist höchstens gelegentlich in für den Pilz kritischen Zeiten während des Infektionsvorganges möglich. Dies konnten wir verschiedentlich beobachten. Hat die Infektion aber einmal gehaftet, so wird das Wachstum des Erregers durch die Kallusbildung nicht mehr gestört, wie uns auch die Erfahrungen mit künstlichen Infektionen an den etwa 10 000 geprüften Individuen zeigen.

### 3. Thyllenbildung als Reaktion auf den Befall durch *Endothia parasitica*

BRAMBLE (1938) beobachtete, daß *Endothia*-kranke Kastanien mit starker Thyllenbildung reagieren. In eigenen Untersuchungen konnten wir ebenfalls parasitogen ausgelöste Thyllenbildung an Kastanien und Eichen feststellen. Die reagierenden Gewebe waren pilzfrei. Eine Fernwirkung des Erregers durch stimulierende Stoffwechselprodukte ist durchaus denkbar, insbesondere da heute mehrere Toxine von *Endothia parasitica* bekannt sind. Über das Diaporthin (bzw. die Diaporthin-Gruppe) wurde in einer früheren Publikation berichtet (BAZZIGHER, 1953). (Weitere Stoffe wurden kürzlich durch SHIBATA et al. [1953; 1955 a; 1955 b] und TANAKA et al. [1955] beschrieben). Injektionen von Diaporthin-Rohextrakten in junge Kastanienbäume zeigten uns, daß eine toxische Auslösung der Thyllenbildung möglich ist. Diese Versuche müssen allerdings noch mit reinem Diaporthin wiederholt werden.

Durch die Thyllenbildung wird der Wasserhaushalt empfindlich gestört und führt (hauptsächlich im Frühsommer) zu den bekannten Welkeerscheinungen. Sie beschleunigt somit die Krankheit durch schnelleres Absterben von Pflanzenteilen. Sie hat im Falle von *Endothia parasitica* keinen Abwehrcharakter, da dieser Pilz sowohl zur saprophytischen als auch zur parasitischen Lebensweise befähigt ist.

### 4. Die Bildung von Korkbarrieren

BRAMBLE (1936) zeigte, daß *Endothia*-kranke Kastaniengewebe von den gesunden Teilen häufig durch Korkbarrieren getrennt sind. Auch BIRRAGHI (1951) beobachtete diese Schutzgewebe, und eigene Untersuchungen bestätigen dies. Wundkorkbarrieren, welche im Zusammenhang mit dem *Endothiabefall*

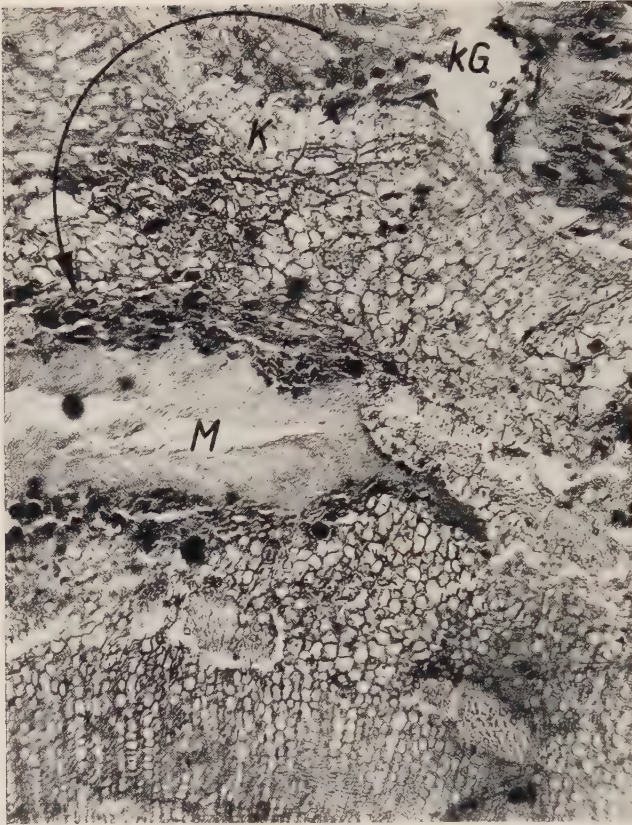


Abb. 1. Querschnitt durch *Endothia*-kranke Kastanienrinde. Durch eine Korkbarriere (K) war das gesunde vom kranken Gewebe (KG) getrennt, bis dem Erreger der Durchbruch in die gesunde Rinde gelang. Die Durchbruchstelle ist auf dem Bilde nicht zu sehen (der Pfeil soll sie nur andeuten). Im neubefallenen Gewebe wachsen die Pilzhyphen gebündelt in Form von Myzelmaten (M). Vergrößerung: etwa 70  $\times$

gebildet werden, sind beinahe an jedem Baum festzustellen. Ihre Bedeutung als Abwehrreaktion ist aber sehr unterschiedlich. Die Bedingungen, die zur Ausbildung des Schutzgewebes führen, sind derart variabel, daß die Gewebeproliferation außerordentlich unregelmäßig ist. In den Schutzbarrieren sind sozusagen immer Lücken vorhanden, die durchbrochen werden können (Abb. 1). Eine gewisse Bedeutung haben die Suberinwände in den äußeren Rindenpartien, wenn eine Ausstoßung der erkrankten und abgestorbenen Gewebe durch Abschorfung möglich ist. Dies ist bei *Fagus silvatica* L. der Fall, wo bei annähernd 100 % der befallenen Pflanzen ein Abwehrerfolg zu beobachten ist. Früher wurde berichtet, daß *Endothia parasitica*-Infektionen an Buchen gelangen (BAZZIGHER, 1953). Die erkrankten Pflanzen wurden weiterhin beobachtet und auf Abwehrreaktionen hin untersucht. Durch Bildung einer Korkbarriere und durch Ausstoßung der erkrankten Gewebe sind sämtliche Bäume ausgeheilt. Abbildung 2 zeigt einen Schnitt durch eine solche Stelle. Das dürfte erklären, daß Buchen in der freien Natur nicht befallen werden, und daß auch keine Gefahr hierfür besteht. Ähnliche Abschorfungen sind auch bei Kastanien zu beobachten (Abb. 3). Sobald aber der Pilz in tiefere Rindenpartien eingedrungen ist, wird der Abwehrerfolg dieser Reaktion



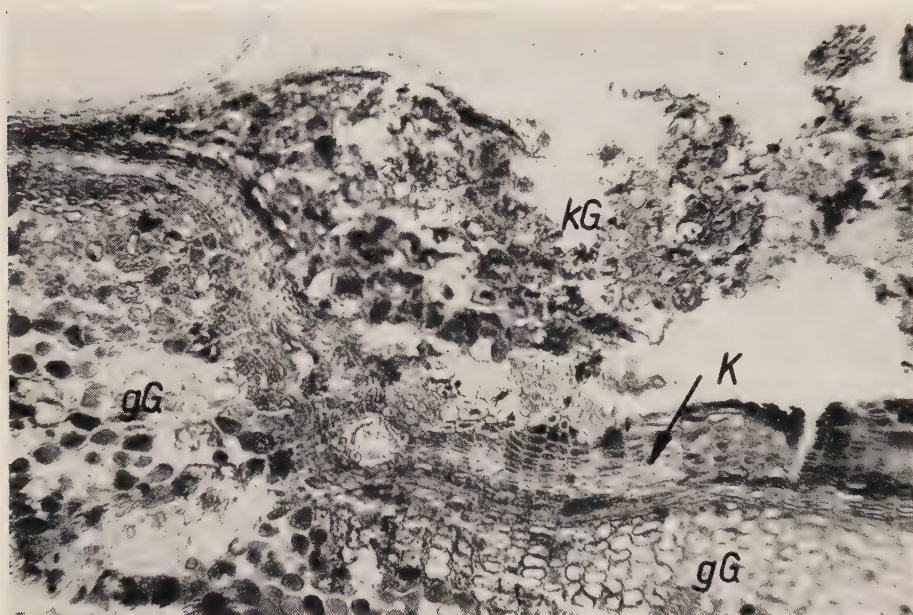


Abb. 2. Abschorfung *Endothia*-kranker Rindengewebe (kG) bei *Fagus silvatica* L.  
K = Korkbarriere, gG = gesundes Gewebe. Vergrößerung: etwa 200 ×

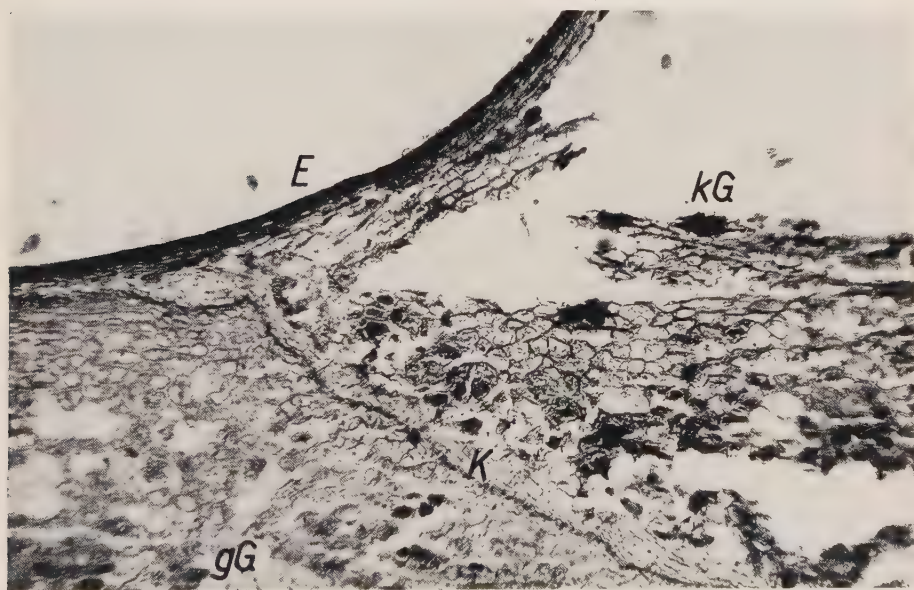


Abb. 3. Abschorfung *Endothia*-kranker Rindengewebe (kG) bei *Castanea sativa* Müller.  
gG = gesundes Gewebe, K = Korkbarriere, E = Epidermis. Vergrößerung: etwa 70 ×

immer geringer, da infolge der Mächtigkeit der Rindenpartien die abgeriegelten und abgestorbenen Gewebe mit dem Erreger nicht mehr ausgestoßen werden können. Der Pilz lebt saprophytisch weiter, bis ihm ein Durchbruch durch die Schutzmauer wieder möglich wird. Wir sehen an diesem Beispiel, wie ein Erreger durch die Fähigkeit zur saprophytischen Lebensweise zu

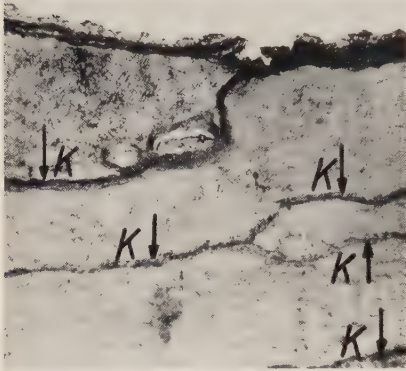


Abb. 4. Schnitt durch eine *Endothia*-Läsion mit Ausheilungstendenz an *Castanea sativa* Miller. Bildung mehrerer Korkbarrieren (K). Vergrößerung: etwa 15 ×

einem besonders gefährlichen Parasiten werden kann, und es mag paradox klingen, wenn wir behaupten, daß erst durch diese Fähigkeit *Endothia-parasitica*-Epidemien möglich werden, wie wir sie heute bei der Kastanie erleben. Läsionen mit Ausheilungstendenz, bei denen der Infekt sogar durch mehrere Korkbarrieren abgeriegelt wurde (Abb. 4), konnten oft beobachtet werden; aber stets fanden wir an der gleichen Läsion Stellen, durch die der Pilz wieder eindringen konnte und erneut eine heftige Erkrankung hervorrief. Je günstiger die Bedingungen für den Saprophytismus sind, um so geringer sind die Chancen einer Ausheilung

durch Abschorfung. Es wird deshalb verständlich sein, daß *Endothia*-Läsionen in alter Kastanienrinde kaum ausheilen können, während die Voraussetzungen hierfür in jungen Geweben eher gegeben sind. Außerdem ist junges Gewebe an und für sich reaktionsfähiger als altes und ermöglicht auch dadurch eher eine Ausheilung. Die erhöhte Reaktionsfähigkeit jung-rindiger Stockausschläge, wie sie BIRRAGHI (1951) beobachtete, zeigt dies besonders gut. Wir müssen dies aber als Sonderfälle betrachten, denn im allgemeinen und auf lange Sicht gesehen ist die histogene Abwehr bei Kastanien gegenüber *Endothia* sehr unsicher. Manchmal wird überhaupt kein Schutzgewebe gebildet (Abb. 5). Wie für das Entstehen des Kallus sind auch für die Korkbildung verschiedene Faktoren verantwortlich, über die wir leider bis heute noch zu wenig wissen. Sicher sind diese Faktoren sehr variabel und lassen die Reaktion von Zufälligkeiten abhängig erscheinen. Vielleicht ist es möglich, durch Selektion Individuen zu finden, die ein stärkeres Abwehrvermögen durch Schutzkorkbildung besitzen.

### C. Wuchsstoffe und Resistenz

Wuchsstoffheterotrophie eines Erregers und der Wuchsstoffmangel der Wirtspflanze können unter Umständen entscheidende Faktoren der Ausbreitungsresistenz sein (GÄUMANN, 1951). Nach LILLY und BARNETT (1951) ist *Endothia parasitica* aneurin- und biotinheterotroph und vermag zudem den Stickstoff nur in Form von Ammoniumnitrat oder organischen Nitraten zu



assimilieren. Ergebnisse eigener Versuche widersprechen diesen Angaben vollständig. In einer früheren Publikation (BAZZIGHER, 1953) wurde dargelegt, daß für das Wachstum von *Endothia parasitica* (Murr.) And. Wuchsstoffe notwendig sind, die in genügender Menge in 0,5 % Difco Yeast Extrakt enthalten sind. Wir haben mit Kombinationen diverser Zusätze von reinen Vitaminen und anderen Wuchsstoffen (in den für die betreffenden Stoffe üblichen Konzentrationen) versucht, diese Stoffe zu identifizieren, und zwar wurde mit verschiedenen *Endothia parasitica*-Stämmen gearbeitet. Das Ergebnis

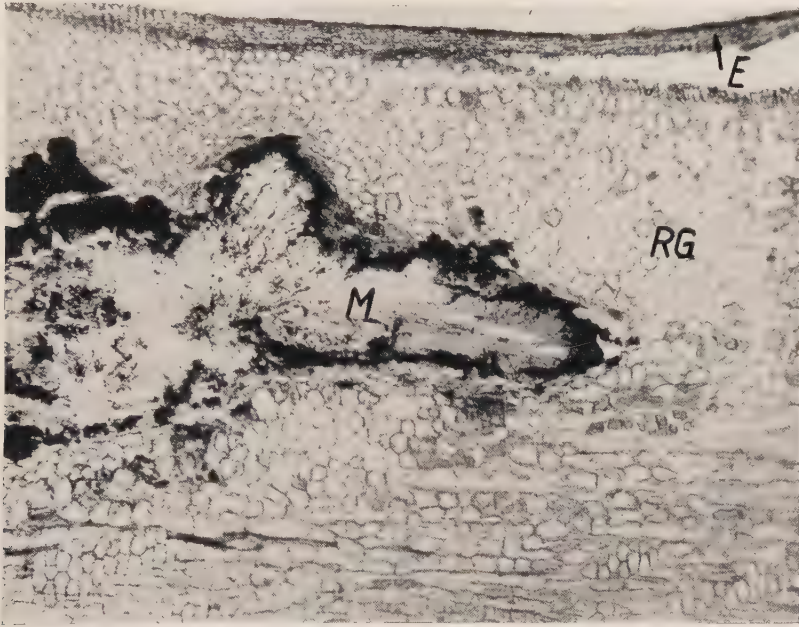


Abb. 5. Schnitt durch Kastanienrinde mit *Endothia*-Myzelmatte. An der Kontaktzone sind dunkelgefärbte, zerstörte Wirtszellen sichtbar. Hier sind kein Kallus und keine Korkgewebe gebildet worden. Vergrößerung: etwa  $80\times$

(siehe Tabelle 1) zeigt, daß *Endothia* weder biotin- noch aneurinheterotroph ist. Ein uns noch nicht bekannter Wuchsstoff oder eine Wuchsstoffgruppe muß im Yeast Extrakt enthalten sein. Alle die untersuchten Vitamine und Aminosäuren können ihn nicht ersetzen. Extrakte aus Kastanienrinde haben eine dem Yeast Extrakt ähnliche Wirkung. Heute wissen wir noch nicht, in welcher Menge diese Wirkstoffe in den resistenten und in den anfälligen Wirten vorhanden sind, und deshalb können wir auch nicht sagen, ob sie für die Resistenz eine Rolle spielen, was durchaus möglich ist. Darüber hoffen wir in einer späteren Publikation zu berichten.

Der papierchromatographische Nachweis dieses Stoffes ist wie folgt möglich: Man benötigt hierzu Whatman Nr. 1-Papier, Lösungsmittelgemisch 313 (nach SCHMIDT [siehe BAZZIGHER, 1957]) und wuchsstofffreie *Endothia*-Platten.



Tabelle 1

Die Wirkung verschiedener Vitamine und anderer Wachstumsstoffe  
(Das Wachstum ist in Zahlen angegeben, die dem Verhältnis der Myzeltrockengewichte der Knop +

Knop (normal m. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Knop (variiert m. $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )										
Glukose 2 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Yeast-Extract										
Adenin	+	+	+	+						
Alanin	+	+	+	+						
Aneurin						+	+			
Arginin	+	+	+	+						
Asparaginsäure	+	+	+	+						
B <sub>12</sub>										
B <sub>2</sub>										
Biotin										
Cystein	+	+	+	+						
L(-)Cystin										
Folsäure										+
Glutaminsäure	+	+	+	+						
Glykokoll	+	+	+	+						
Histidin	+	+	+	+						
Isoleucin	+	+	+	+						
Kaseinhydrolysat										
Leucin	+	+	+	+						
Lysin	+	+	+	+						
Methionin	+	+	+	+						
Nicotinsäure							+	+	+	
Pantothensäure								+	+	
Phenylalanin	+	+	+	+						
Pyridoxal				+						
Pyridoxamin			+	+						
Threonin		+	+	+						
L(-)Tryptophan	+	+	+	+						
Tyrosin	+	+	+	+						
Valin	+	+	+	+						
Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Wachstum (Verhältniszahlen der Myzeltrockengewichte)	2	2	2	2	1	2	4	2	2	



Wuchsstofffreie *Endothia*-Platten = Petrischalen mit 2 Schichten wuchsstofffreiem Knop-Glukose-Agar (Knopsche Lösung + 2% Glukose + 1,5% Agar). In der oberen Schicht sind *Endothia parasitica*-Sporen (Konidien) suspendiert; die untere ist sporenfrei. Der Pilz wächst in solchen Platten nur dort, wo Wuchsstoffe in den Agar diffundieren, also von außen her hinzugefügt werden. Ohne diese Wuchsstoffe ist kein Wachstum möglich, und die Platte bleibt klar, durchsichtig.

Nach dem Chromatographieren wird das Papier während 12 Stunden gut getrocknet und hernach auf die *Endothia*-Platten gelegt. Nach einer halben Stunde kann es wieder entfernt werden, da die Substanzen dann genügend in den Agar diffundiert sind. Nach 2tägiger Inkubation bei 27° C ist *Endothia* überall dort gewachsen, wo Wuchsstoffe im Papier vorhanden waren, und die Rf-Werte lassen sich gut ermitteln. Der *Endothia*-Wuchsstoff, welcher im Yeast-Extrakt vorkommt, hat einen Rf-Wert von etwa 0,7.

#### D. Die experimentelle Beeinflußbarkeit der Resistenz

Während unserer Selektionsarbeiten mit Kastanien (siehe Methodik) wurden im Zusammenhang mit der Resistenzprüfung einheimische und exotische *Castanea*-Spezies mit *Endothia* infiziert. Der durchschnittliche Infektionserfolg während der letzten 2—3 Jahre war bei *Castanea sativa* ungefähr 90—95 %, bei *Castanea mollissima* annähernd 0—1 %. Diese Zahlen illustrieren eindrucklich, daß wir es mit einer sehr anfälligen und mit einer sehr resistenten Kastanienart zu tun haben, was vergleichende Untersuchungen erlaubt.



Abb. 6. Manschettenapplikation von Wirkstoffen an Kastanien. Etwa  $\frac{1}{6}$  nat. Größe

Verschiedene Beobachtungen, die wir im Laufe unserer Arbeiten machen konnten, lassen uns vermuten, daß die Resistenz in starkem Maße an Lebensvorgänge wie Stoffwechsel, Atmung usw. gebunden sein muß. Angeregt durch die Arbeit von GOTHOSKAR, SCHEFFER, STAHMANN und WALKER (1955) wurde folgender Versuch durchgeführt:

Versuchsfrage: Welchen Einfluß haben als Fermenteffektoren wirksame Chemikalien auf die Resistenz von *Castanea mollissima* und *Castanea sativa*? Gearbeitet wurde mit Akriflavin, 2,4-Dinitrophenol, o-Phenanthrolin, Thioharnstoff, Na-azid, Pyrogallol und Hydrochinon.



**Versuchsanordnung:** Applikation der Chemikalien mit der Manschettenmethode (Abb. 6) nach JEPSON, JESSER und COMPLIN (1952) (siehe auch MARTIGNONI und ZEMP, 1956). Je 56 etwa 8jährige *Castanea sativa* und *Castanea mollissima* wurden wie folgt behandelt:

<i>Castanea mollissima</i> Nr.	Substanz Nr.	Substanz	Konzentration	<i>Castanea sativa</i> Nr.	Manschette mit/ohne Wirkstoff
1 – 7	I	Akriflavin	1/1000 M	57 – 63	mit 200 ml
8 – 14	II	Thioharnstoff	1/1000 M	64 – 70	mit 200 ml
15 – 21	III	o-Phenanthrolin	1/1000 M	71 – 77	mit 200 ml
22 – 28	IV	Na-azid	1/1000 M	78 – 84	mit 200 ml
29 – 35	V	2,4-Dinitrophenol	1/1000 M	85 – 91	mit 200 ml
36 – 42	VI	Hydrochinon	1/100 M	92 – 98	mit 200 ml
43 – 49	VII	Pyrogallol	1/100 M	99 – 105	mit 200 ml
50 – 56	VIII	o-Kontrolle	—	106 – 122	ohne

Gleichzeitig wurde überall nach der üblichen Methode (siehe Methodik) infiziert. (Manschetten gefüllt: 6. 7. 56; infiziert: 7. 7. 56; Kontrolle: Mitte November 1956).

Ein ähnlicher Versuch in kleinerem Rahmen wurde mit Thioharnstoff, Na-azid, 2,4-Dinitrophenol und einer Kontrolle unter Gewächshausbedingungen durchgeführt.

**Versuchsergebnis:** Die Erkrankung bei *Castanea sativa* war normal, heftig mit annähernd 100 % Infektionserfolg. Die Erkrankung bei *Castanea mollissima* war überall mittelschwer, mit Infektionserfolg von 60–80 %. Die Kontrolle war leicht erkrankt mit 40%igem Infektionserfolg. Die Gewächshausversuche ergaben ein ähnliches Bild, mit Ausnahme der Kontrollen, die nicht erkrankten.

Die normalerweise resistente *Castanea mollissima* ist durch die Behandlung mit Fermentinhibitoren, deren Hemmwirkung auf den Atmungsmechanismus bekannt ist, anfällig geworden. Ein Zusammenhang zwischen Resistenz und Atmung ist denkbar, doch an Hand dieses Versuches noch nicht zu beweisen (= Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen).

Unsere Ergebnisse zeigen ferner, daß die o-Kontrollen (in Freilandbedingungen) ebenfalls, wenn auch viel schwächer, erkrankten, während die o-Kontrollen im Gewächshaus die übliche Resistenz aufwiesen. Dies weist darauf hin, daß diese Anfälligkeit auf klimatische Faktoren, und zwar auf die Besonderheiten des Versuchsjahres 1956 zurückzuführen ist. Es ist denkbar, daß durch die außerordentliche Kälte des vergangenen Winters der Atmungsmechanismus geschädigt und die Pflanze dementsprechend anfällig wurde. Falsch wäre es, aus diesen Ergebnissen abzuleiten, *Endothia parasitica* sei ein Schwächeparasit. Erreger werden Schwächeparasiten genannt, wenn sie einen Wirt nur dann zu besiedeln vermögen, wenn seine Vitalität krankhaft herabgesetzt ist (GÄUMANN, 1951), und dies trifft bei *Endothia parasitica* auf *Castanea sativa* normalerweise nicht zu, da die vitalsten und gesundensten

Kastanien ebenso heftig befallen werden wie geschwächte. (Ein bekanntes Beispiel eines Schwächeparasiten an Kastanien ist z. B. *Coryneum perniciosum* Br. et Farn. [siehe BAZZIGHER, 1956]. Dieser Pilz ist i m m e r ein Sekundärparasit.) Die vorliegenden Versuche weisen uns die Richtung für unsere weiteren Untersuchungen. Wir hoffen, bald weiteres mitteilen zu können.

### Zusammenfassung

1. Kallusbildung als Reaktion der Wirtsgewebe auf den Befall durch *Endothia parasitica* (Murr.) And. ist sehr häufig zu beobachten. Dieses Schutzgewebe vermag aber im allgemeinen den Krankheitserreger nicht abzuriegeln.

2. Bildung von Korkbarrieren ist in den meisten *Endothia*-kranken Kastaniengeweben festzustellen. Die Abwehr durch diese Schutzgewebe kann in Sonderfällen erfolgreich sein, wie das Beispiel *Endothia*-befallener und nachträglich ausgeheilter Buchen zeigt. Kastanienbäume mit Ausheilungstendenz an den Läsionen konnten verschiedentlich gefunden werden. Trotz der verstärkten Schutzkorkbildung konnte der Erreger aber in keinem uns bekannten Falle am erneuten Eindringen in die kambiale Zone gehindert werden. Bei Kastanien scheint diese Abwehrreaktion recht unterschiedlich und wenig erfolgreich zu sein.

3. Untersuchungen zeigen, daß parasitogene und toxigene Auslösung der Thyllenbildung möglich ist.

4. *Endothia parasitica* (Murr.) And. ist weder aneurin- noch biotinheterotroph. Die Heterotrophie bezieht sich auf einen anderen, uns noch unbekannten Wuchsstoff, der in Difco Yeast Extrakt enthalten ist. Ein unterschiedlicher Wuchsstoffgehalt der Wirtspflanzen könnte entscheidend für ihre Anfälligkeit oder Resistenz sein.

5. Durch die Behandlung mit Fermentinhibitoren wird *Castanea mollissima* gegen *Endothia parasitica* anfällig. Ein Zusammenhang zwischen Resistenz und Atmung ist denkbar.

Frostwirkung kann ebenfalls die Krankheitsdisposition dieser sonst resistenten Kastanienart erhöhen. Möglicherweise schädigt die Kälte den Atmungsmechanismus.

### Summary

1. Formation of callus as a reaction of host tissue to infection by *Endothia parasitica* (Murr.) And. occurs very often. This protective tissue is generally unable to stop the pathogen.
2. Formation of cork barriers can be observed in most of the chestnut tissues attacked by *Endothia parasitica*. In certain cases, these tissues can protect the host successfully, as is shown in the case of curing of in-

fectured beech trees. A healing tendency in the lesions of chestnut trees could be observed frequently. In spite of the reinforced protective cork formation, the pathogen attacked the cambium zone anew in all cases studied. These protective reactions seem to be very variable and to achieve little success in chestnut trees.

3. Tylose formation may possibly be associated with parasitism and toxin production.
4. *Endothia parasitica* is neither heterotrophic for aneurine nor biotine. The heterotrophy is correlated with another growth substance, contained in yeast extract, presently unknown. A variation in the amount of growth substances in the host plant might be decisive for the presence or absence of disease.
5. By the treatment with certain inhibitors of respiration enzymes, *Castanea mollissima* trees become susceptible to *Endothia parasitica*. There is a possible correlation between disease resistance and the extent of respiration.  
Frost might have an increasing effect on the susceptibility of these otherwise resistant chestnut species. Coldness possibly damages the respiration mechanism.

### Literaturverzeichnis

- BAVENDAMM, W., 1936: Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holz-zersetzenden Pilze. In ABDERHALDEN, Handb. biol. Arbeitsmeth. **12**, 927—1134, Wien.
- BAZZIGHER, G., 1953: Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And., dem Erreger des Kastaniensterbens. Phytopath. Z. **21**, 2, 105—132.
- —, 1955: Über tannin- und phenolspaltende Fermente von *Endothia parasitica*. Phytopath. Z. **24**, 3, 265—282.
- —, 1956: Pilzschäden an Kastanien nördlich der Alpen. Schweiz. Z. für Forstwesen **107**, 11, 694—695.
- —, 1957: Tannin- und phenolspaltende Fermente dreier parasitischer Pilze. Phytopath. Z. **29**, 299—304.
- BIRRHAGHI, A., 1951: Caratteri di resistenza in *Castanea sativa* nei confronti di *Endothia parasitica*, Roma. Tipografia del Senato.
- BRAMBLE, W. C., 1936: Reaction of chestnut bark to invasion by *Endothia parasitica*. Am. J. of Bot. **23**, 2, 89—94.
- —, 1938: Effect of *Endothia parasitica* on conduction. Am. J. of Bot. **25**, 1, 61—65.
- GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl., Verlag Birkhäuser, Basel. 681 S.
- GOTHOSKAR, S. S., R. P. SCHEFFER, M. A. STAHMANN and J. C. WALKER, 1955: Further studies on the nature of *Fusarium* resistance in Tomato. Phytopathology **45**, 303.
- HESS, H. und E. MÜLLER, 1951: Zur Entwicklungsgeschichte von *Dothidella inculpta* (Wallr.) Theiss. et Syd. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 34 S.
- JEPPSON, L. R., M. J. JESSER and J. O. COMPLIN, 1952: Tree trunk application as a possible method of using systemic insecticides on citrus. J. econ. Ent. **45**, 669—671.



- JOHANSEN, D. A., 1940: Plant Microtechnique. New York and London, 523 S.
- KISSER, J., 1932: Die botanisch-mikrotechnischen Schneidemethoden. In ABDERHALDEN, Handb. biol. Arbeitsmethoden 4, 391—738, Wien.
- KÜSTER, E., 1925: Pathologische Pflanzenanatomie. Verlag G. Fischer, Jena. 558 S.
- LILLY, V. G., and H. L. BARNETT, 1951: Physiology of the Fungi. McGraw-Hill Book Comp., Inc. New York, Toronto, London. 464 S.
- MARTIGNONI, M. E. und H. ZEMP, 1956: Versuch zur Bekämpfung des Lärchenblasenfußes *Taeniothrips laricivorus* Kratochvíl und Farský (*Thripidae*, *Thysanoptera*) mit einem systemischen Insektizid. Mitt. schweiz. Anst. forstl. Versuchsw. 32, 1, 3—23.
- SHIBATA, S., et al., 1953: On the Coloring Matter Produced by *Endothia parasitica* Fr. and *Endothia radicalis*. Pharm. Bull. 1, 302—304.
- —, 1955 a: Metabolic Products of Fungi IV. Pharm. Bull. 3, 274—277.
- —, 1955 b: Metabolic Products of Fungi V. Pharm. Bull. 3, 278—283.
- TANAKA, O., et al., 1955: Metabolic Products of Fungi VI. Pharm. Bull. 3, 284—286.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik  
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*

*Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann*

## Die Verteilung der radioaktiven Fusarinsäure in Tomatensprossen

Von

H. KERN, B. D. SANWAL, V. FLÜCK und D. KLUEPFEL

*Mit 4 Abbildungen*

**Inhalt:** Einleitung. — 1. Kapitel. Die Verteilung der Fusarinsäure in den Organen der Pflanze. — 2. Kapitel. Die Verteilung der Fusarinsäure in den Geweben. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

### Einleitung

Fusarinsäure (5-n-Butyl-pyridin-2-carbonsäure, Molekulargewicht 179,2) ist ein von verschiedenen pflanzenparasitischen Pilzen gebildetes Welke-toxin. Die Verbindung wurde unter anderem aus Reinkulturen von *Fusarium lycopersici* Sacc. isoliert und läßt sich auch in infizierten Pflanzen nachweisen (ausführliche Angaben und Literatur bei GÄUMANN, 1957).

GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL (1952) zeigten, daß die Wirkung der Fusarinsäure auf abgeschnittene Tomatensprosse vom pH der Giftlösung abhängt. Bei hohem pH (6 und darüber) werden nur die Blätter, bei tiefem pH (z. B. 4,3) auch die Stengel geschädigt. Dies hängt wahrscheinlich mit dem unterschiedlichen Dissoziationsgrad der Fusarinsäure zusammen. Die bei pH 4,3 zu 98 % undissoziierten Fusarinsäuremoleküle dringen leicht in die Gewebe des Stengels ein und schädigen sie. Die bei pH 6 zu rund 50 % dissoziierten Moleküle tun dies nur in geringerem Maße (SMALL, 1929); ein größerer Teil der Fusarinsäure gelangt mit dem Transpirationsstrom in die Blätter und dringt erst nach Anreicherung und damit verbundener Verschiebung des Dissoziationsgrades ins Innere der Zellen ein. Die Abhängigkeit des Eindringungsvermögens der Fusarinsäure vom Dissoziationsgrad und damit vom pH der Lösung läßt sich auch in Atmungsversuchen an Hefezellen zeigen (REUSSER und NAEF-ROTH, 1956).

Es ist demnach zu erwarten, daß die Fusarinsäure je nach dem pH der Lösung in den Tomatensprossen verschieden verteilt wird. Die vorliegende Arbeit versucht diese Frage mit Hilfe von radioaktiv markierter Fusarinsäure zu prüfen.

Als Versuchspflanzen dienten vierblättrige, etwa 10 cm hohe Sprosse der Tomatensorte Tuckswood (Abb. 1). Sie wurden im Gewächshaus gezogen und unter konstanten Bedingungen mit radioaktiver Fusarinsäure vergiftet.



Abb. 1. Die Einteilung einer typischen Versuchspflanze in Stängel- und Blattstücke. Die punktierten Stücke wurden in der Gruppe „Stängel“, die leer gelassenen in der Gruppe „Blätter“ zusammengefaßt. Die letztere Gruppe umfaßte somit auch den größten Teil der Blattstiele.  $\frac{1}{2}$  natürl. Größe

Die verwendete Fusarinsäure (HARDEGGER und NIKLES, 1956) war in der Carboxylgruppe mit  $C^{14}$  markiert. Sie hatte ursprünglich eine

Radioaktivität von 13,9 mC/Millimol und wurde je nach Bedarf mit inaktiver Fusarinsäure verdünnt.

Die Durchführung dieser Arbeiten wurde von der FRITZ HOFFMANN-LA ROCHE-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ermöglicht. Der zweitgenannte Verfasser erhielt ferner Stipendien von der Schweizerischen Koordinationskommission für die technische Hilfe und von der VOLKART-Stiftung. Allen diesen Institutionen sei auch hier unser bester Dank ausgesprochen. Den Herren Prof. Dr. E. HARDEGGER und E. NIKLES möchten wir für die Synthese radioaktiver und inaktiver Fusarinsäure herzlich danken.

## 1. KAPITEL

### Die Verteilung der Fusarinsäure in den Organen der Pflanze

**Versuchsfrage:** Wie verteilt sich die Fusarinsäure (und ihre Abbauprodukte) auf Stängel und Blätter der Tomatensprosse?

Möglichst identische Tomatensprosse wurden mit markierter Fusarinsäure (150 mg pro kg Frischgewicht) bei pH 4,3 und bei pH 7,0 vergiftet. Die einen Pflanzen wurden unmittelbar nach beendeter Giftaufnahme, die andern erst nach anschließendem 48stündigem Stehen in Leitungswasser in je 13 Stücke geschnitten, getrocknet und verbrannt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem ELA-2-64-Zähler der Firma LANDIS & GYR A. G., Zug (Schweiz), und einem EQB-1-Geiger-Müller-Zählrohr (Fensterdurchmesser 25 mm, Fensterdicke 2 mg/cm<sup>2</sup>). Einzelheiten der Methode sind bei SANWAL (1956) beschrieben. Die Anordnung der einzelnen Stücke ist aus Abb. 1 ersichtlich; die Unterschiede zwischen den Versuchspflanzen waren durchweg sehr gering.

Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Radioaktivität auf die Stängel und Blätter einiger typischer Pflanzen. Die für die einzelnen Stücke gemessenen



Gesamt radioaktivitäten (d. h. ohne Berücksichtigung des Gewichtes der Stücke) wurden nach dem Schema der Abbildung 1 zusammengezählt und in Prozenten der ursprünglich verabreichten Radioaktivität ausgedrückt. Zu betonen ist, daß dabei nur Radioaktivität als solche gemessen wurde; ob diese von der Fusarinsäure selbst oder von einem ihrer Umwandlungsprodukte (SANWAL, 1956; KLUEPFEL, 1957) stammte, ließ sich mit dieser Methode nicht entscheiden.

Tabelle 1

Radioaktivität in Stengel und Blättern von Tomatensprossen nach Vergiftung mit Fusarinsäure, dargestellt in Prozent der verabreichten Radioaktivität (Erklärung im Text)

pH	Zeitpunkt der Verbrennung	Pflanze Nr.	Verteilung der Radioaktivität		
			Stengel %	Blätter %	Verlust %
4,3	sofort nach Giftaufnahme	1	66	27	7
		2	67	28	5
		3	65	25	10
	48 Stunden später	4	5	62	33
		5	5	59	36
		6	6	73	21
7,0	sofort nach Giftaufnahme	7	47	44	9
		8	42	47	11
	48 Stunden später	9	19	67	14
		10	18	53	29

Wir betrachten zunächst die Verteilung der Fusarinsäure unmittelbar nach Beendigung der Giftaufnahme (1—2 Stunden nach Beginn der Giftzugabe); in diesem Zeitpunkt dürfte erst ein kleiner Teil der Fusarinsäure in andere Verbindungen umgewandelt worden sein.

Bei pH 4,3 finden sich 65—67 % der verabreichten Radioaktivität im Stengel und 25—28 % in den Blättern. Die Verluste betragen 5—10 %. Die Radioaktivität ist also im Stengel etwas mehr als doppelt so hoch wie in den Blättern. Die Streuungen waren bei den sofort nach Giftaufnahme verbrannten Pflanzen durchweg gering; auch bei Wiederholung der Versuche in verschiedenen Jahreszeiten zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

Bei pH 7,0 finden sich 42—47 % der verabreichten Radioaktivität im Stengel und 44—47 % in den Blättern. Die Verluste betragen 9—11 %. Die Radioaktivität ist also im Stengel ungefähr gleich hoch wie in den Blättern.

Diese Ergebnisse entsprechen dem Sinn nach durchaus den Erwartungen. Wird die Fusarinsäure in einer Lösung vom pH 4,3 verabreicht, dringt der größere Teil davon in die Gewebe des Stengels ein; dieser zeigt dementsprechend starke Welkesymptome (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL, 1952, Tabellen 4—6). Bei pH 7,0 (und nach orientierenden Versuchen auch schon bei pH 6,0) ist die im Stengel verbleibende Fusarinsäuremenge ge-

ringer und reicht entsprechend den früheren Versuchen nicht mehr aus, um eine äußerlich sichtbare Schädigung hervorzurufen. Umgekehrt ist die in die Blätter gelangende Fusarinsäuremenge bei pH 7,0 größer und verursacht stärkere Symptome als bei pH 4,3.

Auf das Frischgewicht von Stengeln und Blättern berechnet, ergibt sich im Stengel bei pH 4,3 eine Dosis von rund 300 mg, bei pH 7,0 eine solche von rund 200 mg pro kg Frischgewicht. Zwischen diesen Werten lag also in unseren Versuchen die Mindestdosis, die notwendig ist, um die Stengel sichtbar zu schädigen.

In den Blättern betragen die entsprechenden Dosen bei pH 4,3 rund 70 mg und bei pH 7,0 rund 160 mg pro kg Frischgewicht. Hier genügt also eine geringere Dosis, um morphologische Symptome (Nekrosen usw.) auszulösen. Natürlich geben diese Werte keine direkten Anhaltspunkte für die Wirkungsschwelle der Fusarinsäure im Zellplasma; das Toxin wird ja in den Geweben nicht gleichmäßig verteilt, sondern an einzelnen Stellen angereichert (vgl. 2. Kapitel). Daß die dicken Stengelgewebe mehr Fusarinsäure aufnehmen können, ohne nach außen geschädigt zu erscheinen, ist durchaus verständlich.

Wie verändert sich nun die Verteilung, wenn die Tomatensprosse nach beendeter Giftaufnahme 48 Stunden in Wasser gestellt werden?

Bei pH 4,3 finden sich (wiederum nach Tabelle 1) nur noch 5—6 % der ursprünglich verabreichten Radioaktivität im Stengel und 59—73 % in den Blättern. Die Radioaktivität ist also in den Blättern mehr als zehnmal so hoch wie im Stengel. Die Verluste betragen 21—36 %. Bei pH 7,0 finden sich noch 18—19 % der Radioaktivität im Stengel und 53—67 % in den Blättern. Die Radioaktivität ist also hier in den Blättern rund dreimal so hoch wie im Stengel. Die Verluste betragen 14—29 %.

In den 48 Stunden nach der Giftaufnahme wird somit ein großer Teil der radioaktiven Substanzen (Fusarinsäure und ihre Umwandlungsprodukte) vom Stengel in die Blätter verschoben. Nach 48 Stunden ist der im Stengel verbliebene Anteil der Radioaktivität bei pH 4,3 geringer als bei pH 7,0; das Verhältnis hat sich also umgekehrt und entspricht nicht mehr dem Verhältnis der äußerlich sichtbaren Schädigungen an Stengel und Blättern. Die wesentlichen Vergiftungsvorgänge, welche im Plasma die pathologischen Reaktionen einleiten und schließlich zu den Nekrosen führen, müssen sich daher relativ früh abspielen. Wie in andern Fällen sind es auch hier die Vorgänge während der Inkubationszeit, also im Frühstadium vor dem Auftreten sichtbarer Symptome, die den Krankheitsverlauf bestimmen (KERN, 1956). Was in dieser Zeit in der Pflanze passiert, ist erst teilweise bekannt. Von der verabreichten Fusarinsäure wird ein Teil decarboxyliert, ein Teil methyliert und ein Teil in noch unbekannter Weise umgewandelt; nur ein Rest von rund 40 % bleibt unverändert in der Pflanze (SANWAL, 1956; KLUEPFEL, 1957). Die Decarboxylierung scheint zu einer Erhöhung der Giftwirkung (mindestens der Störung der Wasserper-

meabilität; BACHMANN, 1956) zu führen, während die Methylierung einen Entgiftungsprozeß darstellt. Ob sich die Ergebnisse der Verteilungsversuche durch eine unterschiedliche Umwandlung der Fusarinsäure bei verschiedenen pH-Werten der Lösung erklären lassen (wobei die Abbauprodukte verschieden rasch vom Stengel in die Blätter verlagert würden), bleibt noch zu untersuchen.

Die Verluste an Radioaktivität sind hier wesentlich höher als bei den sofort nach beendeter Giftaufnahme verbrannten Pflanzen. Rund 10 % der Verluste können als Versuchsfehler betrachtet werden. Die durch Decarboxylierung der Fusarinsäure verlorene Radioaktivität beträgt nach den Versuchen von SANWAL (1956) in den ersten 48 Stunden 5—7 %; das pH spielt dabei eine geringe Rolle. Worauf die übrigen Verluste (die ja auch von Pflanze zu Pflanze beträchtlich variieren) zurückzuführen sind, muß im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen über die Umwandlung der Fusarinsäure noch geklärt werden. Das Wasser, in dem die Pflanzen während 48 Stunden standen, wies nur Spuren von Radioaktivität auf.

## 2. KAPITEL

### Die Verteilung der Fusarinsäure in den Geweben

Die Frage der Lokalisierung radioaktiver Substanzen in bestimmten Gewebepartien läßt sich mit Hilfe der Radioautographie verfolgen.

#### 1. Methode

Zur Herstellung der Mikrotomschnitte wurden die Gewebe in einer mit Quecksilbersulfat gesättigten Lösung von 80 % Methanol in Wasser fixiert, über Alkohol und Xylol in Paraffin eingebettet und etwa  $7\ \mu$  dick geschnitten. Bei dieser Fixiermethode waren die Verluste durch Auswaschung trotz der guten Wasserlöslichkeit der Fusarinsäure nur gering. Für die Radioautographien eigneten sich Eastman-Kodak-NTB-Platten mit einer Emulsionsdicke von etwa  $10\ \mu$  am besten. Nach Befeuchten der Emulsion während einer Minute mit filtriertem, destilliertem Wasser wurden die Paraffinschnitte auf die Emulsion gebracht, im Luftstrom getrocknet und während 14 Tagen bei  $0^\circ\text{C}$  im Dunkeln exponiert. Nach Entfernung des Paraffins durch Xylol und anschließender Trocknung kamen die Platten (mitsamt den Gewebeschnitten) für 20 Minuten in EASTMAN-KODAK-19b-Entwickler und schließlich für eine Stunde in EASTMAN-KODAK-F<sub>5</sub>-Lösung zur Fixierung. Platten und Schnitte wurden zum Schluß in Heidenhains Haematoxylin (mit 4 % Eisenalaun) gefärbt und über Alkohol und Xylol in Kanadabalsam eingebettet. Weitere methodische Angaben finden sich zum Beispiel bei SANWAL (1956).

#### 2. Die Verteilung der Fusarinsäure im Stengel

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen Schnitte durch den Stengel von Tomatensprossen nach Vergiftung mit radioaktiver Fusarinsäure bei pH 4,3



und 6,0. Beide Schnitte wurden unmittelbar nach beendeter Giftaufnahme hergestellt. Der Schwärzungsgrad gibt ein Maß für die Radioaktivität der eingelagerten Substanzen. Das Bild ist bei den beiden pH-Werten deutlich verschieden.

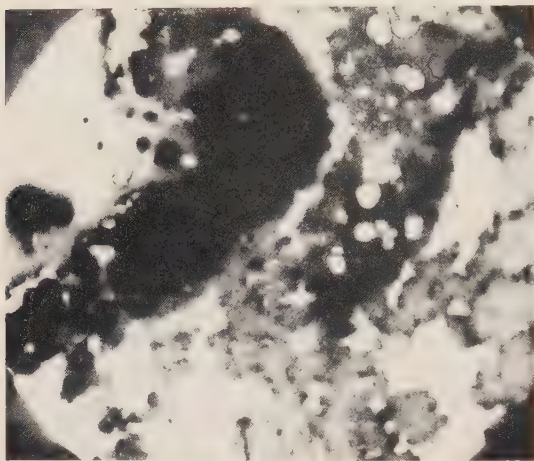


Abb. 2. Schnitt durch einen Tomatenstengel nach Vergiftung mit radioaktiver Fusarinsäure bei pH 4,3. Die Stengelaußenseite befindet sich links oben; die an dieser Stelle von Anfang an vorhandene Rille hat sich unter der Fusarinsäurewirkung bereits etwas vertieft. Vergr. 48 (Aufnahme Photogr. Institut E. T. H.)

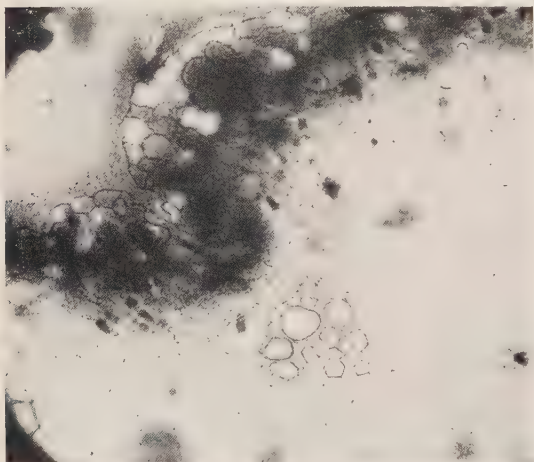


Abb. 3. Schnitt durch einen Tomatenstengel nach Vergiftung mit radioaktiver Fusarinsäure bei pH 6,0. Die auch hier von einer Rille durchzogene Stengelaußenseite befindet sich links oben und ist noch intakt. Vergr. 125 (Aufnahme Photogr. Institut E. T. H.)

Bei pH 4,3 finden sich radioaktive Substanzen in den Geweben über den Gefäßbündeln, in den Zellen zwischen den Gefäßen und im Mark des Stengelzentrums. In den inneren Partien des Stengels, wo die Gesamtradioaktivität relativ gering ist, läßt sich die Konzentration der radioaktiven Substanzen im Innern der Zellen deutlich erkennen; die stark radioaktiven äußeren Stengelteile erscheinen ziemlich gleichmäßig schwarz.

Bei pH 6,0 ist die Radioaktivität wesentlich geringer und auf die äußeren Stengelgewebe beschränkt. Die — wenn auch geringe — Transpiration des Stengels führt also zu einer gewissen Anreicherung der Fusarinsäure, doch ist diese zu gering, um sichtbare Schäden zu verursachen. Ein Teil der Radioaktivität findet sich im Zellinnern, ein Teil aber auch deutlich in den Interzellularräumen; bei der rund 50% igen Dissoziation der Fusarinsäuremoleküle in der Lösung (die offenbar in den Gefäßen nicht wesentlich verschoben wird) erscheint dies durchaus verständlich.

### 3. Die Verteilung der Fusarinsäure in den Blättern

In den Blättern wird die Fusarinsäure (und ihre Umwandlungsprodukte) in der Regel an bestimmten Stellen der Blattspreite — den Stellen, die schlußendlich nekrotisch werden — angereichert.

Ob an diesen Stellen die Transpiration besonders stark ist, bleibt noch zu untersuchen.

Abbildung 4 zeigt einen Schnitt durch eine solche Stelle. In den Blattnerven ist die Radioaktivität sehr gering, in den Interkostalfeldern dagegen sehr hoch; die Fusarinsäure dringt zum

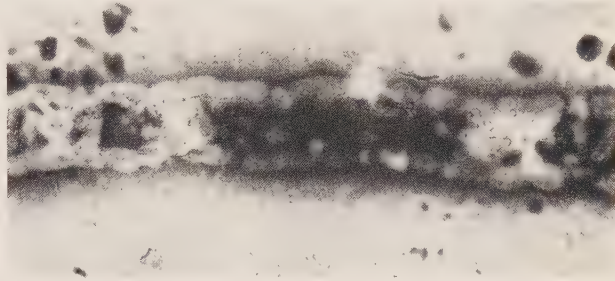


Abb. 4. Schnitt durch eine stark radioaktive Stelle eines Tomatenblattes nach Vergiftung mit radioaktiver Fusarinsäure. Vergr. 125 (Aufnahme Photogr. Institut E. T. H.)

großen Teil ins Zellinnere ein. Unterschiede zwischen den bei tiefem und hohem pH vergifteten Pflanzen waren auf diesen Schnitten nicht festzustellen; dies mag auf die starke örtliche Anreicherung der Fusarinsäure an den betreffenden Blattstellen zurückzuführen sein.

#### Zusammenfassung

Wir können uns von der Verteilung der radioaktiven Fusarinsäure in abgeschnittenen Tomatensprossen das folgende vereinfachte Bild machen:

1. In den ersten paar Stunden nach Beginn der Giftaufnahme gelangt die Fusarinsäure zum Teil in die Gewebe des Stengels und zum Teil in die Interkostalfelder der Blätter. Sowohl die Gesamtmenge der Fusarinsäure im Stengel als auch der ins Innere der Stengelzellen eindringende Anteil sind bei einem tiefen pH der Giftlösung (z. B. 4,3) größer als bei einem hohen pH (6 und darüber). Dies dürfte durch die unterschiedliche Dissoziation der Fusarinsäuremoleküle bedingt sein.
2. Im Stengel und in den Blättern vergiftet die Fusarinsäure die Wirtszellen. Ihr Wirkungsmechanismus ist noch nicht bekannt; wir wissen nur, daß die Fusarinsäure selbst dabei chemisch verändert wird (zum Teil durch Decarboxylierung, zum Teil durch Methylierung und zum Teil auf noch unbekannten Wegen). Die zur Auslösung sichtbarer Nekrosen notwendige Fusarinsäuredosis ist (auf das totale Frischgewicht der Organe berechnet) im Stengel höher als in den Blättern; sie wird im Stengel nur bei tiefem pH, in den Blättern dagegen bei allen untersuchten pH-Werten der Giftlösung erreicht.
3. In den folgenden 48 Stunden (in denen die Pflanzen in Wasser stehen) wird ein Teil der radioaktiven Verbindungen aus dem Stengel in die Blätter verschoben, und zwar ist dieser Anteil bei pH 4,3 größer als bei pH 6 und 7. Worauf dies zurückzuführen ist (unterschiedlicher Ab-

bau der Fusarinsäure bei verschiedenem pH usw.), muß noch untersucht werden. Jedenfalls stimmt die Verteilung der Fusarinsäure und ihrer Umwandlungsprodukte in den Tomatensprossen nach 48 Stunden nicht mehr mit dem Bild der sichtbaren Schädigungen (Nekrosen usw.) überein; die entscheidenden Vergiftungsreaktionen müssen also vorher eintreten.

### Summary

1. C<sup>14</sup>-labeled fusaric acid was applied to tomato cuttings at pH 4,3 and pH 7,0 of the toxin solution. After uptake of 150 mg fusaric acid per kg fresh weight in 1 to 2 hours the cuttings were replaced in water. The distribution of the toxin in the plant was studied by means of combustion and radioautography.
2. Immediately after toxin uptake a higher amount of fusaric acid in the stem may be found at pH 4,3 than at pH 7,0; in the leaves, more fusaric acid may be found at pH 7,0. This corresponds to the distribution of visible symptoms on the plant (necroses etc.).
3. The amount of fusaric acid which penetrates into the stem cells is higher at pH 4,3 than at pH 7,0. At pH 4,3, most of the molecules are not dissociated and penetrate easily into the cells; at pH 7,0, penetration into the protoplasm is reduced because a great percentage of the molecules are dissociated.
4. During the 48 hours following toxin uptake, a considerable amount of fusaric acid and its metabolic products is translocated from the stem to the leaves. This translocation is more pronounced at pH 4,3 than at pH 7,0; the reason for this difference is not yet known. After 48 hours, the distribution of the radioactive substances does no longer correspond to the distribution of external symptoms; the important reactions, therefore, must happen in an early phase of intoxication.

### Literaturverzeichnis

- BACHMANN, E., 1956: Der Einfluß von Fusarinsäure auf die Wasserpermeabilität von pflanzlichen Protoplasten. *Phytopath. Z.* **27**, 255—288.
- GÄUMANN, E., 1957: Über Fusarinsäure als Welketoxin. *Phytopath. Z.* **29**, 1—44.
- —, ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. *Phytopath. Z.* **20**, 1—38.
- HARDEGGER, E., und E. NIKLES, 1956: Fusarinsäure-(carboxyl-<sup>14</sup> C) und quaternäre Derivate der Fusarinsäure. *Helv. Chim. Acta* **39**, 223—229.
- —, und — —, 1956: Untersuchungen in der Pyridin-Reihe; ein neuer Weg zur Fusarinsäure. *Helv. Chim. Acta* **39**, 505—513.
- KERN, H., 1956: Problems of incubation in plant diseases. *Ann. Rev. Microbiology* **10**, 351—368.
- KLUEPFEL, D., 1957: Über die Biosynthese und die Umwandlungen der Fusarinsäure in Tomatenpflanzen. *Phytopath. Z.* **29**, 349—379.
- REUSSER, P., und ST. NAEF-ROTH, 1956: Über den Einfluß der Fusarinsäure auf den Gaswechsel von *Saccharomyces cerevisiae* Hans. *Phytopath. Z.* **26**, 273—296.
- SANWAL, B. D., 1956: Investigations on the metabolism of *Fusarium lycopersici* Sacc. with the aid of radioactive carbon. *Phytopath. Z.* **25**, 333—384.
- SMALL, J., 1929: Hydrogen-ion concentration in plant cells and tissues. *Protoplasma-Monographien* 2, Berlin.



Note sur *Uromyces acetosae* Schroeter  
et *Uromyces borealis* Liro

par

CH. TERRIER

Dans l'ouvrage qu'il a publié récemment, VIENNOT-BOURGIN (1956, p. 235—237) signale que *Rumex arifolius* All. peut, en France, servir de support à deux *Uromyces* autoxènes: *Uromyces acetosae* Schroeter et *Uromyces borealis* Liro. (Voir également GUYOT, 1938, p. 300—314.) Il attire l'attention sur le fait que cette dernière espèce n'y a été trouvée qu'une seule fois, dans les environs de Chamonix (Haute-Savoie), par le Dr. E. MAYOR (1929, p. 175). Cette citation vint me rappeler que j'ai récolté sur ce même *Rumex*, en juin 1952, en montant de la maison forestière „Les Sauvas“ au Pic-de-Bure (Hautes-Alpes), une rouille présentant des téléutosores étroitement associés à des écidies et qui, par conséquent, pouvait éventuellement être aussi rapportée à *Urom. borealis*. C'est en vue de vérifier cette hypothèse que j'ai repris l'étude de ce matériel et que je l'ai comparé à l'échantillon de Haute-Savoie. Je réitère ici l'expression de ma vive gratitude au Dr E. MAYOR qui a eu l'obligeance de mettre ce dernier à ma disposition.

Avant d'exposer le résultat de cette étude, il y a lieu de rappeler quels sont les éléments permettant de distinguer ces deux *Uromyces*.

LIRO (1908, p. 77) donne le nom d'*Uromyces borealis* à la rouille récoltée sur *Rumex arifolius* All. par KARSTEN à Kola, en Laponie, au mois de juillet 1861, et que ce dernier distribua (*Fungi fenn. exs.* No 197) sous le nom d'*Aecidium flavum* Karst. D'après son auteur, *Urom. borealis* diffère d'*Urom. acetosae* Schroet. „du fait que son cycle évolutif est réduit, les urédos paraissant n'avoir aucune importance biologique pour le champignon. Au point de vue de leur morphologie, ces deux espèces concordent, mais les téléutospores d'*Urom. borealis* ont une ornementation réticulée mieux marquée“. Et LIRO ajoute: „Sur les feuilles de *Rumex arifolius* (celui-ci déterminé comme *Rumex Acetosa*) récoltées par KARSTEN en Laponie se trouvent, d'une part, uniquement des écidies, d'autre part, uniquement des téléutosores qui émergent autour, ou sous les pseudopérïdies des écidies. On observe un comportement presque identique sur le matériel provenant de Suède distribué par VESTERGREN (*Microm. rar. sel.* No 446). Il ne se forme pas d'urédosores,

mais des urédospores isolées apparaissent dans les jeunes téléutosores, comme cela se produit chez *Urom. ficariae* (Schum.) Lév."

En résumé, *Uromyces acetosae* Schroet. présente les stades S, I, II, III, et, par conséquent, se comporte comme une auto-eu-urédinale. Quant à *Urom. borealis* Liro, il ne formerait que les stades I et III; il évoluerait donc comme une auto-opsi-urédinale. Ainsi, a priori, les caractères différentiels de ces deux champignons paraissent bien nets.

Le matériel provenant du Pic-de-Bure présente, sur les pétioles des feuilles de *Rumex arifolius* All., des écidies réparties en groupes et disposées, au sein de ceux-ci, en lignes entre les stries du pétiole. Elles sont entremêlées de téléutosores brun noirâtre, se distinguant assez mal sur le fond violacé sombre des tissus de la plante-hôte. C'est cet aspect particulier du champignon et la présence côte à côte des écidies et des téléutosores qui m'avaient frappé lors de la récolte et qui m'étaient restés en mémoire. De la l'idée surgie dernièrement, lorsque je consultai l'ouvrage de VIENNOT-BOURGIN, que peut-être j'avais découvert une seconde station d'*Uromyces borealis* dans les Alpes françaises.

Sur les feuilles du matériel en question, le parasite se présente différemment. Les écidies occupent des plages décolorées, plus ou moins circulaires lorsqu'elles se trouvent sur la face du limbe, allongées lorsqu'elles chevauchent sur la nervure médiane. Au centre de la plage, elles sont serrées les unes contre les autres, tandis qu'à la périphérie, elles sont plus espacées et plus ou moins irrégulièrement disposées en cercles concentriques. Quoique naissant sur les deux faces du limbe, elles sont plus nombreuses à la face inférieure qu'à la face supérieure. Certains amas écidien ont une teinte blanchâtre, d'autres une teinte fauve. Quelques plages portant les écidies ont leur centre occupé, à la face supérieure, par quelques rares spermogonies. Alors que les urédosores font défaut sur les pétioles, ils sont abondants sur le limbe, tant à la face supérieure qu'à la face inférieure. Pulvérulents, de couleur brun cannelle, ils sont dispersés de manière désordonnée. Les téléutosores, petits, noirâtres, partiellement encore recouverts par l'épiderme, sont également amphigènes et distribués sans ordre. On peut observer, à la loupe, que certains urédosores donnent naissance à des téléutospores, celles-ci se distinguant aisément du fait de leur couleur plus foncée.

Etant donné que sur les feuilles on observe les stades S, I, II et III, alors que sur les pétioles ne se trouvent que des écidies étroitement associées à des téléutosores, il paraissait plausible d'admettre que ce matériel hébergeait simultanément deux rouille différentes, soit *Urom. acetosae* sur le limbe et *Urom. borealis* sur les pétioles, d'autant plus qu'il semblait, à en juger par les différences de couleur, que l'on se trouvait en présence de deux types d'écidies: un type blanchâtre, appartenant au cycle évolutif de la première espèce, et un type fauve (= ? *Aecidium flavum* Karst.) appartenant à celui de la seconde.

Comme d'après LIRO, en plus de l'absence d'urédospores, *Urom. borealis* se distingue d'*Urom. acetosae* essentiellement par l'ornementation mieux marquée des téléutospores et comme, d'autre part, les auteurs ne donnent aucune

indication précise concernant les dimensions de ces dernières chez *Urom. borealis*, j'ai pensé que peut-être des mesures statistiques mettraient en évidence si, effectivement, le matériel en question était parasité par deux organismes différents. J'ai donc mesuré la longueur et la largeur de deux cents téléutospores prélevées respectivement: 1<sup>o</sup> sur les pétioles, 2<sup>o</sup> dans les téléutospores sur le limbe et, 3<sup>o</sup> dans les urédosores sur le limbe également. Les résultats de ces mensurations sont consignées dans le tableau 1 (échantillons 1—3). Il ressort de ce dernier qu'aucune différence significative n'existe en ce qui concerne la longueur des téléutospores, quel que soit l'endroit où elles ont été prélevées. C'est à peine si celles recueillies sur les pétioles sont un peu plus étroites que celles ayant pris naissance sur les feuilles. Toutefois, si faible que soit cette différence, elle pouvait laisser subsister l'idée que le champignon sur les pétioles pouvait n'être pas identique à celui sur le limbe.

Tableau 1

Dimensions des téléutospores d'*Uromyces acetosae* Schroeter et d'*Uromyces borealis* Liro

Echantillon	No	Extrême	— $\sigma$	Moyenne	+ $\sigma$	Extrême	$\frac{L}{l}$
Longueur en $\mu$							
<i>Uromyces acetosae</i>	1	21,1	24,8	27,12	29,5	34,1	
	2	22,3	26,0	27,86	29,7	34,1	
	3	21,1	25,0	26,88	28,7	34,1	
	4	21,1	25,5	27,15	28,8	31,7	
	5	20,0	24,2	25,89	27,6	32,9	
	1—5	20,0	24,8	26,90	29,0	34,1	
„ <i>Uromyces borealis</i> “	6	20,0	24,7	26,65	28,5	32,9	
Largeur en $\mu$							
<i>Uromyces acetosae</i>	1	15,3	19,6	21,80	24,0	27,0	1,24
	2	17,6	21,0	22,73	24,5	29,4	1,22
	3	17,6	21,6	23,14	24,7	29,4	1,16
	4	16,4	20,4	21,94	23,4	28,2	1,23
	5	16,4	21,2	22,86	24,5	29,4	1,13
	1—5	15,3	20,5	22,49	24,4	29,4	1,19
„ <i>Uromyces borealis</i> “	6	16,4	20,5	22,11	23,7	28,2	1,20

1. Sur *Rumex arifolius* All.: Les Sauvas — Pic-de-Bure, Montmaur (Htes-Alpes), 24 juin 1952, leg. CH. TERRIER. Téléutospores mêlés aux écidies sur les pétioles.
2. Idem. Téléutospores sur feuilles.
3. Idem. Téléutospores naissant dans les urédosores sur feuilles.
4. Sur *Rumex arifolius* All.: Digue de l'Inn près de Celerina, Engadine, 22 juillet 1942, leg. E. GÄUMANN.
5. Sur *Rumex arifolius* All.: Eboulis au fond du Vallon de la Pierreuse sur Château-d'Oex (Ct. de Vaud), 17 août 1952, leg. CH. TERRIER.
6. Sur *Rumex arifolius* All.: Près du Châlet des Pyramides sur les Bossons. Env. 1850 m., Vallée de Chamonix (Hte-Savoie), 24 août 1928, leg. Dr. E. MAYOR.



Il convenait alors de démontrer: 1<sup>o</sup>, que les téléutospores prélevées sur le limbe se rapportent bien à *Uromyces acetosae*, et, 2<sup>o</sup>, que celles recueillies sur les pétioles ont les mêmes dimensions que les téléutospores d'*Urom. borealis* provenant de Haute-Savoie.

Pour élucider le premier point, j'ai mesuré deux cents spores chez deux échantillons d'*Urom. acetosae* typique, récoltés, l'un en Engadine, sur la digue de l'Inn près de Celerina le 22 juillet 1942 par E. GÄUMANN, l'autre dans le canton de Vaud, dans les éboulis au fond du vallon de la Pierreuse sur Château-d'Oex, le 17 août 1952, par moi-même. Les valeurs obtenues (tabl. 1, échantillons 4 et 5) montrent clairement que les téléutospores provenant du Pic-de-Bure ne diffèrent nullement de celles d'*Uromyces acetosae* croissant sur la même plante-hôte en d'autres endroits des Alpes.

En ce qui concerne le second point, les mesures effectuées sur deux cents téléutospores de l'échantillon de Haute-Savoie, dont l'étiquette est libellée comme suit: „*Uromyces borealis* Liro, sur feuilles de *Rumex arifolius* All., formes écidio-téléutosporees. Près du Chalet des Pyramides sur les Bossons. Altitude 1850 m. Vallée de Chamonix, 24 août 1928“, ne révélèrent aucune différence significative (tabl. 1, échant. No 6) avec celles se rapportant à *Urom. acetosae*. Par conséquent, il faut en conclure que soit les dimensions des téléutospores d'*Urom. borealis* concordent avec celles des téléutospores d'*Urom. acetosae*, comme le laissait déjà entendre LIRO, soit alors le champignon de Haute-Savoie ne doit pas être rapporté à la première, mais à la seconde espèce.

En vue de vérifier cette seconde hypothèse, j'ai procédé à l'examen très minutieux de l'abondant matériel récolté aux environs de Chamonix par le Dr MAYOR. J'ai finalement pu y déceler, au centre d'un amas écidien, à la face supérieure du limbe, quelques spermogonies et, d'autre part, quelques rares urédospores dans des urédosores primaires vétustes qui, macroscopiquement, ont un aspect très semblable à celui qu'offrent de vieilles écidies, d'autant plus que ces urédosores se trouvent sur des plages décolorées du limbe. Ainsi, vu la présence simultanée des stades S, I, II, III dans l'échantillon de Haute-Savoie, il semble établi que cette rouille doit être rapportée à *Urom. acetosae* Schroet. et non à *Urom. borealis* Liro.

On peut se demander s'il existe effectivement sur *Rumex arifolius* une rouille qui réponde exactement à la définition d'*Urom. borealis* telle qu'elle est donnée par LIRO.

Rappelons à ce propos que cet auteur a établi la diagnose de sa nouvelle espèce d'après un échantillon d'herbier récolté quelque cinquante ans auparavant par KARSTEN. Il se peut fort bien que ce dernier ait eu en mains une forme semblable à celle de Haute-Savoie, où les spermogonies et même que les urédos sont rares, et que dans le matériel qu'il a distribué, ces deux stades ne s'y soient pas trouvés. Il est alors assez compréhensible que LIRO se soit senti autorisé à distinguer cette rouille d'*Urom. acetosae*. Or, LINDFORS (1913, p. 53), qui a eu l'occasion d'étudier plusieurs récoltes faites en Laponie du parasite de *Rumex arifolius*, remarque cependant que celui-ci est susceptible

parfois de produire des urédosores et que d'autre part l'ornementation de la membrane des téléutospores est très variable, d'où il en conclut que le nom spécifique donné par LIRO à ce champignon ne saurait être maintenu, le seul valable étant *Urom. acetosae* Schroet. KARI (1936, p. 10) procède de façon inverse; citant *Urom. borealis* Liro, il ajoute: „syn. ? *Urom. acetosae* Schroeter“. JØRSTAD (1951, p. 59) considère carrément l'espèce de LIRO comme synonyme d'*Urom. acetosae*, car pour lui „the absence of uredo is an adaptation to short season“. HYLANDER, JØRSTAD et NANNFELDT (1953, p. 85) font de même, sans plus donner d'explication. Donc, d'après les auteurs nordiques, il paraît définitivement établi que l'*Uromyces* rencontré dans les régions septentrionales de l'Europe sur *Rumex arifolius* se rapporte à l'espèce *acetosae* Schroeter.

La question qui se pose toutefois est de savoir si, dans le cadre de l'espèce morphologique *Urom. acetosae* Schroet., *Urom. borealis* Liro ne constitue pas une forme biologique spéciale, inféodée à *Rumex arifolius*. Cela paraît peu probable, car, si l'on s'en réfère aux résultats des infections expérimentales effectuées par GÄUMANN (1931, p. 404), il ne semble pas exister de spécialisation chez *Uromyces acetosae*, celui-ci étant susceptible d'infecter avec la même intensité: *Rumex Acetosa* L., *R. arifolius* All., *R. thyrsiflorus* Fingerh. et *R. Acetosella* L., espèces dont les trois premières sont rangées par LÖVE (1948, p. 107) dans la section *Euacetosae* (Löve) Löve du genre *Acetosa* Mill. emend. Löve, et la dernière dans le genre *Acetosella* Löve. Il est vrai que les essais de GÄUMANN n'ont pas porté sur le „*Rumex arifolius* (= *R. Acetosa* L. var. *alpina* L.) des auteurs scandinaves, *Rumex* qui, selon HYLANDER (1945, p. 132), n'est vraisemblablement pas identique à celui qui croît dans le massif alpin de l'Europe centrale, mais doit en être distingué sous le nom de *Rumex Acetosa* L. ssp. *lapponicus* Hiitonen [= *Acetosa arifolia* (All.) Schur ssp. *lapponica* (Hiit.) Löve]. La distinction entre la forme arctique et la forme medioeuropéenne de „*Rumex arifolius*“ est cependant trop subtile pour que l'on puisse admettre, sans preuve expérimentale, que la première héberge une rouille qui lui soit strictement inféodée, d'autant plus qu'elle appartient également à la section *Euacetosae*. Ce point de vue est encore renforcé du fait que l'absence de spermogonies et la réduction du stade urédo chez *Urom. acetosae* ne s'observent pas seulement en Laponie, mais aussi dans les Alpes. Cette modification du cycle évolutif du parasite ne dépend, par conséquent, pas strictement des conditions vitales particulières que lui offre une espèce, respectivement une sous-espèce végétale déterminée, en l'occurrence *Rumex arifolius* sensu aut. scand.; elle relève avant tout des conditions climatiques, soit que celles-ci influencent directement le parasite, soit indirectement, et conjointement, par leur action sur la plante-hôte.

### Résumé

L'*Uromyces* que l'on rencontre sur *Rumex arifolius* All. dans les Alpes doit être rapporté à *Uromyces acetosae* Schroeter et non à *Uromyces borealis* Liro, ce dernier nom étant synonyme du premier.

## Ouvrages cités

- GÄUMANN, E., 1931: Über die Biologie des *Uromyces rumicis* I. Ann. mycol. **29**, 399—405.
- GUYOT, A. L., 1938: Les Urédinées (ou Rouilles des Végétaux). I. *Uromyces*. Encyclop. mycol. **8**, 438 p. Paris.
- HYLANDER, N., 1945: Nomenklatorische und systematische Studien über nordische Gefäßpflanzen. Uppsala Univ. Årsskr. **7**, 337 p.
- —, I. JØRSTAD et J. A. NANNFELDT, 1953: *Enumeratio uredinearum scandinavicarum*. Opera botanica **1** (1), 102 p.
- JØRSTAD, I., 1952: The *Uredinales* of Iceland. Skrifter utgitt av det Norske Videnskap-Akad. i Oslo. 1. Math.-Naturv. Kl. 1951, No. 2, 87 p.
- KARI, L. E., 1936: Mikromyceten aus Finnisch-Lappland. Ann. Bot. Soc. Zool.-Bot. Fenn. Vanamo **8** (3), p. 1—24.
- LINDFORS, TH., 1913: Aufzeichnungen über parasitische Pilze in Lule-Lappland. Svensk Bot. Tidskr. **7**, p. 39—57.
- LIRO, J. I., 1908: *Uredineae fennicae*. Bidr. till Kännedom om Finlands natur och folk. H. 65, 640 p. Helsingfors.
- LÖVE, A., and D. LÖVE, 1948: Chromosome numbers of Northern plant species. Dept. of Agric. Rep. Ser. B, **3**, 131 p., Reykjavik.
- MAYOR, E., 1929: Herborisations mycologiques dans la région de Chamonix (Hte-Savoie). Bull. Soc. mycol. de France **45**, p. 171—183.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1956: Mildious, Oidiums, Caries, Charbons, Rouilles des Plantes de France. Encyclop. mycol. **26** (texte), 317 p.; **27** (atlas), 89 planches. Paris.



Aus dem botanischen Institut der Königlichen Forsthochschule, Stockholm

Prof. E. Björkman

## Über den Stoffwechsel und eine antibiotisch wirksame Substanz von *Polyporus annosus* Fr.

Von

A. PERSSON

Mit 16 Abbildungen

Inhalt: Einleitung und Problemstellung. — Methodik. — Experimenteller Teil. 1. Temperatur; 2. Toxigenes Welken; 3. Verschiedene Nährlösungen; 4. Mit Weinsäure und Ammoniumnitrat; 5. Ohne Weinsäure und Ammoniumnitrat; 6. pH-Wert; 7. Saccharose- und Weinsäureabbau; 8. Aminosäuren; 9. Analyse des Toxines mittels Papierchromatographie. — Diskussion. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

### Einleitung und Problemstellung

Unter der großen Zahl von Pilzen, die lebende Forstbäume angreifen, nimmt der Wurzelfäule bedingende *Polyporus annosus* Fr. aus forstbiologischen und ökonomischen Gesichtspunkten zweifellos den hervorragenden Platz in Nordeuropa ein. Folgt man der Nomenklaturdarstellung von JÖRGENSEN (1954), so ist der hier behandelte Basidiomycet *Polyporus annosus*. Dadurch wird die Priorität ELIAS FRIEß von 1821 berücksichtigt. Im Jahre 1874 beschrieb ROBERT HARTIG diesen Pilz zum ersten Male als Erreger der Wurzelfäule an Forstbäumen und nannte ihn *Trametes radiciperda*. In der englischsprachigen Literatur ist der Name *Fomes annosus* (Fr.) Cke. gebräuchlich. CUNNINGHAM hat den Pilz unter *Fomitopsis annosa* (Fr.) Cunngh. als Typus für die Gattung *Fomitopsis* aufgestellt. Ferner sind *Polyporus cryptarum* (Bull.) Fr., *Ungulina annosa* (Fr.) Pat., *Heterobasidion annosa* Brefeld und *Cunninghamella meinechella* Olson Synonyme des gleichen Pilzes.

Phytopathologisch kann der Pilz als typisches Beispiel für einen fakultativen Parasiten dienen. So tritt er bei *Picea abies* (L.) Karst. als Saprophyt in den zentralen Teilen der Wurzeln und Stämme auf (v. HOPFFGARTEN, 1933, JÖRGENSEN et al. 1939). Der Baum wird nicht primär infolge des Angriffes getötet, sondern geknickt oder vom Sturm im späteren Altersstadium gefällt. Ganz anders ist das Krankheitsbild desselben Pilzes bei *Pinus silvestris* L. Hier werden nur die Wurzeln angegriffen, die Wasserzuführung blockiert,

und der Baum stirbt in kurzer Zeit durch Vertrocknen. Im ersten Fall kann man die Krankheit als chronisch, im letzten als akut bezeichnen.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde versucht, physiologische und toxigene Unterschiede an Pilzstämmen, die von verschiedenen Wirtsarten, der Fichte bzw. Kiefer, isoliert wurden, zu fassen. Dann seien die Ergebnisse über eine Reihe von Kulturversuchen vorgelegt. Diese wurden mit dem Ziel, etwas über die Toxinproduktion bei *Polyporus annosus* Fr. zu erfahren, ausgeführt. Schließlich sei die Isolierung und Verarbeitung des hergestellten Toxines beschrieben.

Der letzte Teil der Untersuchung erfolgte vorwiegend im Institut für Spezielle Botanik an der ETH in Zürich. Es ist mir ein besonderes Bedürfnis, dem Vorstand des Instituts, Herrn Professor Dr. E. GÄUMANN, für wohlwollende Unterstützung und anregende Diskussionen während der Durchführung dieser Untersuchung herzlichst zu danken. „Fonden för Skoglig Forskning“, Stockholm, hat durch wiederholte finanzielle Beiträge die Durchführung der Arbeiten ermöglicht.

## Material und Methodik

### Der Pilz

Von sterbenden Kiefern und Wurzelstöcken der Fichte wurden Fruchtkörper eingesammelt und Myzelkulturen auf Malzagar hergestellt. Verschiedene ausländische Forscher und Institute haben weiter Reinkulturen des Pilzes zur Verfügung gestellt. In der folgenden Tabelle sind Herkunft und Wirtspflanze aller hier verwendeten Stämme angegeben.

Nr.	Wirtspflanze	Ort	Land
1	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Ekebo, Skåne	Schweden
2	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Nancy	Frankreich
3	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Nourmainen, Tammerfors	Finnland
4	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Suffolk	England
5	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Ulstrup	Dänemark
6	<i>Pinus</i> sp. ....	Virginia	USA
23 : II	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Listerlandet, Blekinge	Schweden
23 : III	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Listerlandet, Blekinge	Schweden
23 : IV	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Listerlandet, Blekinge	Schweden
50 : IV	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Hornsborg, Småland	Schweden
57	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Gunnarp, Halland	Schweden
62	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Åsumtorp, Skåne	Schweden
77	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Norje, Blekinge	Schweden
G 1	<i>Picea abies</i> Karst. ....	Omberg, Östergötland	Schweden
G 5	<i>Picea abies</i> Karst. ....	Kuramåla, Småland	Schweden
G 8	<i>Picea abies</i> Karst. ....	Kaysersberg, Rhin	Frankreich
G 9	<i>Picea abies</i> Karst. ....	Hvidkilde, Fyn	Dänemark
G 12	<i>Picea abies</i> Karst. ....	T 204	Deutschland
L D 1	<i>Larix decidua</i> Mill. ....	Torbenfeldt, Sjöland	Dänemark
L L 1	<i>Larix leptolepis</i> L. ....	Farum, Sjöland	Dänemark
H G	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Hornsborg, Småland	Schweden
Ö S	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Örnås, Halland	Schweden
S O	<i>Pinus silvestris</i> L. ....	Sjöbo, Skåne	Schweden

## Nährlösungen

Mod. RAULIN	g/l	Mod. RICHARD	g/l	Mod. CZAPEK-Dox	g/l
Saccharose	46,60	Saccharose	50,00	Saccharose	30,00
Weinsäure	2,66	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10,00	NaNO <sub>3</sub>	3,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,40	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,00	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,70	MgSO <sub>4</sub>	0,10	MgSO <sub>4</sub>	0,50
KCO <sub>3</sub>	0,40	FeCl <sub>3</sub>	Spur	KCl	0,50
MgCO <sub>3</sub>	0,26	Aneurin	10 ml	FeSO <sub>4</sub>	0,01
CaSO <sub>4</sub>	0,16	(Stammlösung 10 000 µ/l)		Aneurin	10 ml
ZnSO <sub>4</sub>	0,05	Biotin	10 ml	(Stammlösung 10 000 µ/l)	
FeSO <sub>4</sub>	0,06	(Stammlösung 50 mµ/l)		Biotin	10 ml
Kaliumsilikat	0,06	Dest. Wasser auf 1000 ml		(Stammlösung 50 mµ/l)	
Aneurin	10 ml			Dest. Wasser auf 1000 ml	
(Stammlösung 10 000 µ/l)					
Biotin	10 ml				
(Stammlösung 50 mµ/l)					
Dest. Wasser auf 1000 ml					

Mod. TUBEUF	g/l	Mod. RICHARD 5	g/l	Mod. BARNE	g/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10,00	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,00	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub>	1,00	MgSO <sub>4</sub>	2,50	KNO <sub>3</sub>	1,00
Milchsäure	2,00	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,02	d-Glukose	10,00
Aneurin	20 ml	Saccharose	40,00	Aneurin	20 ml
Dest. Wasser auf 1000 ml		Aneurin	20 ml	Dest. Wasser auf 1000 ml	
		Dest. Wasser auf 1000 ml			

Corn Steep Liquor	g/l	Glykokoll	g/l	„Buchenspäne“	g/l
Saccharose	20,00	Glykokoll	25,00	NaNO <sub>3</sub>	3,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,00	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7,00	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,00	KCl	0,50
MgSO <sub>4</sub>	0,25	MgSO <sub>4</sub>	2,50	MgSO <sub>4</sub>	0,50
FeSO <sub>4</sub>	0,01	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,02	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,01
Corn Steep Li.	80,00	Aneurin	20 ml	Dextrose	40,00
Aneurin	20 ml	Dest. Wasser auf 1000 ml		Corn Steep Li.	5,00
Dest. Wasser auf 1000 ml				Aneurin	20 ml
				Dest. Wasser auf 1000 ml	

Bakterien-Bouillon	g/l	Malz-Agar	g/l
Oxo 1 Lab. Lemco	3,0	Malzextrakt Difco	20,0
Pepton	5,0	Agar	30,0
NaCl	2,5	Leitungswasser auf 1000 ml	
NaOH bis pH 7,2			
Leitungswasser auf 1000 ml		Reis-Kultur	je Kolben:
Für Bakterien-Agar Zusatz von 17 g Agar/l		Reis	20 g
		Leitungswasser	40 g



## Biologische Testmethoden

### Qualitativer Tomatentest

Die Tests wurden im ersten Abschnitt nach GENTILE (1951) wie folgt ausgeführt. Tomatenpflanzen mit drei bis vier Fiederblättern werden abgeschnitten und in kleine Kulturröhren mit den zu prüfenden Lösungen gesetzt. Die Röhren werden mit Watte verschlossen und unter künstliches Licht gestellt. Ablesung der Symptome findet nach 1, 8, 24 und 48 Stunden statt, wobei Verfärbung und Nekrosen beurteilt werden. Die Kontrollen stehen in dest. Wasser.

Im zweiten Abschnitt wurde nach den Methoden von GÄUMANN, NAEF-ROTH und REUSSER (1950) gearbeitet. Tomatenpflanzen mit vier Fiederblättern werden abgeschnitten und zu je drei in kleine Kulturröhren gesetzt. Gewöhnlich prüft man die Testlösungen in folgenden Konzentrationen: 1 : 0, 1 : 5 und 1 : 10. Drei Kontrollpflanzen stehen entweder in „nichtfermentierter“ Nährlösung oder in Wasser. Die Röhren werden unter eine Brücke von Leuchtstoffröhren in eine temperatur- und feuchtigkeitsgeregelte Welkekammer gesetzt. Die Pflanzen werden nach sechs Stunden aus den Testlösungen in größere Röhren mit dest. Wasser übertragen und nach 48 Stunden die Symptome an Blättern und Stengeln gemäß einer Skala von 0 bis 4 beurteilt (GÄUMANN et al. 1952).

Die Blattskala:

- 0 — keine sichtbare Wirkung;
- 1 — Blattspitzen geschädigt;
- 2 — Blattspitzen und Blattränder geschädigt, erstes Fiederblatt mit vereinzelten Fleckennekrosen;
- 3 — Blattspitzen und Blattränder geschädigt, sämtliche Fiederblätter mit Fleckennekrosen;
- 4 — Alle Fiederblätter mit starken Fleckennekrosen bedeckt.

Das Resultat der Beurteilung wird in Form eines Bruches geschrieben mit den Blattsymptomen als Zähler und den Stengelsymptomen als Nenner.

### Bakterien-Teste

Die Bakterienteste wurden nach YAMATODANI (LINSKENS 1955 S. 187) ausgeführt. In Petrischalen von 10 cm Durchmesser gießt man mit einem „Papagei“ eine Bodenschicht von 17 ml 2%igem Agar und darauf mit einem 5-ml-„Papagei“ eine dünne Schicht von bakterienbeimpftem Nähragar. Der Nähragar wird bei 35 bis 40 ° C gehalten, und je 100 ml Agar gibt man 1 ml Bakterienbouillon hinzu, in welcher die Bakterien 48 Stunden bei 37 ° C gewachsen sind. Die Bouillon wird mit einer Öse je 4 ml Lösung aus einer Stammkultur der Bakterien beimpft. Diese Bakterienplatten können bis eine Woche bei + 3 ° C aufbewahrt werden. Für Tests der antibiotisch wirksamen Substanzen befeuchtet man kreisrunde Filterpapiere von 6 mm Durchmesser mit der zu testenden Lösung und legt sie auf die Platten. Diese werden umgestülpt „über Nacht“ bei 37 ° C entwickelt und dann der Durchmesser vorliegender Hemmzonen in Millimeter gemessen.

Für die Teste standen folgende von Dr. ETLINGER, Zürich, und Dr. M. NORLIN, Lund, überlassene Bakterien zur Verfügung:

ETH	2016	<i>Bacillus subtilis</i>
ETH	2018	<i>Bacterium coli</i>
ETH	2040	<i>Bacterium megatherium</i>
ETH	2049	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
ETH	2065	<i>Streptococcus faecalis</i>
ETH	2070	<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>Micrococcus pyogenes</i> v. <i>aureus</i> )
ETH	2072	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Lund	2515	<i>Staphylococcus aureus</i>
Lund	483	<i>Staphylococcus aureus</i>
ETH	M 108	<i>Candida vulgaris</i>

## A n a l y s e

### Myzel

Das Myzel jedes Kolbens wurde durch ein vorher getrocknetes und austariertes Filterpapier (S & S Nr. 3) filtriert, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen, über Nacht in  $+60^{\circ}\text{C}$  vorgetrocknet und dann vier Stunden bei  $103^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Die Trockensubstanz wurde in einen Exsiccator gebracht, bei reduziertem Druck abgekühlt und auf einer Analysenwaage gewogen.

### Zuckerbestimmung

Der Zucker wurde nach BERTRAND als Glukose bestimmt (KLEIN: Handbuch d. Pflanzenanalyse Bd. II S. 782).

### Weinsäurebestimmung

Die Weinsäure in den Nährlösungen läßt sich nach der Ceri-Sulfat-Methode bestimmen (KLEIN: Handbuch d. Pflanzenanalyse Bd. II S. 452).

Auch eine andere Methode nach dem Schweizerischen Lebensmittelbuch (1937 S. 294) kam zur Anwendung.

Von den beiden Methoden gab die erste bei einer Serie von Blindtesten mit bekannten Konzentrationen von Weinsäure in dest. Wasser reproduzierbare Resultate. Bestimmungen in nicht fermentierter Nährlösung gaben zu hohe Werte. Eine Extraktion der Weinsäure mit Essigester nach Aussalzen der Lösung mit darauffolgender Bestimmung ließ die Werte zu niedrig ausfallen. Die Bestimmungen liefern daher nur relative Werte.

Die zweite Methode wies in Blindversuchen mit nicht fermentierter Lösung sehr große Schwankungen der Werte auf und wurde aufgegeben. STALDER (1954) hat sie mit Erfolg für seine Weinsäurebestimmungen in Traubensaft benutzt.

### pH-Bestimmung

Die pH-Werte wurden mit einem BECKMAN-pH-Meßgerät mit Glaselektrode erhalten.

### Papierchromatographie

In einem frühen Stadium der Untersuchung wurden papierchromatographische Methoden zur Hilfe genommen, um eine Aufteilung des Rohtoxins in Komponenten zu erzielen. Folgende Lösungsmittel der Methoden von CONSDEN et al. (LINSKENS 1955 S. 132, CRAMER 1954 S. 54) wurden geprüft: Butanol—Eisessig—Wasser (4 : 1 : 5), Phenol—Wasser (wassergesättigt), Äthanol—Ammoniak—Wasser (80 : 4 : 16), Aceton—Wasser (6 : 4) und Pyridin—Wasser (65 : 35).

Für eine eindimensionale Verteilung eignete sich Butanol—Eisessig—Wasser am besten. Bei zweidimensionalen Chromatogrammen diente Phenol als komplettierendes Laufmittel. Die aufsteigende Methode gab die geringsten Störungen und kam deshalb hauptsächlich zur Anwendung. Von den drei benutzten Papiersorten Whatman Nr. 1, Whatman Nr. 3 MM und Schleicher & Schüll Nr. 2045 b eignet sich Whatman Nr. 3 MM zum Anhäufen und Eluieren größerer Substanzmengen. Schleicher & Schüll 2045 b gibt scharf getrennte Flecke, und Whatman Nr. 1 ist ein schnellaufendes Papier zur Orientierung.

Als Entwicklungsreagens diente Ninhydrin in verschiedenen Konzentrationen und daneben Anilinphthalat nach PARTRIDGE (1949). Das Entwickeln erfolgte ein bis fünf Minuten bei 105 ° C.

### Experimenteller Teil

Versuch Nr. 1 : Zuwachs bei verschiedenen Temperaturen.

Folgende Pilzstämme wurden in diesem Versuch benutzt:

Nr.	Wirtspflanze	Nr.	Wirtspflanze
1	Kiefer	G 1	Fichte
2	Kiefer	G 5	Fichte
3	Kiefer	G 8	Fichte
4	Kiefer	G 9	Fichte
5	Kiefer	G 12	Fichte
6	Kiefer	LD 1	Europäische Lärche
23: II	Kiefer	LL 1	Japanische Lärche
23: III	Kiefer		
23: IV	Kiefer		
50: IV	Kiefer		
57	Kiefer		
62	Kiefer		

Aus Schrägagarkulturen wurde ein Myzelstück 1 × 1 mm in das Zentrum einer Malzagarplatte eingimpft. Jedes Versuchsglied bestand aus zwei



Wiederholungen. Die Platten wurden in den Temperaturen + 2 °, + 20 ° und + 38 ° C inkubiert. Der Zuwachs ist als Radius in Millimeter angegeben.

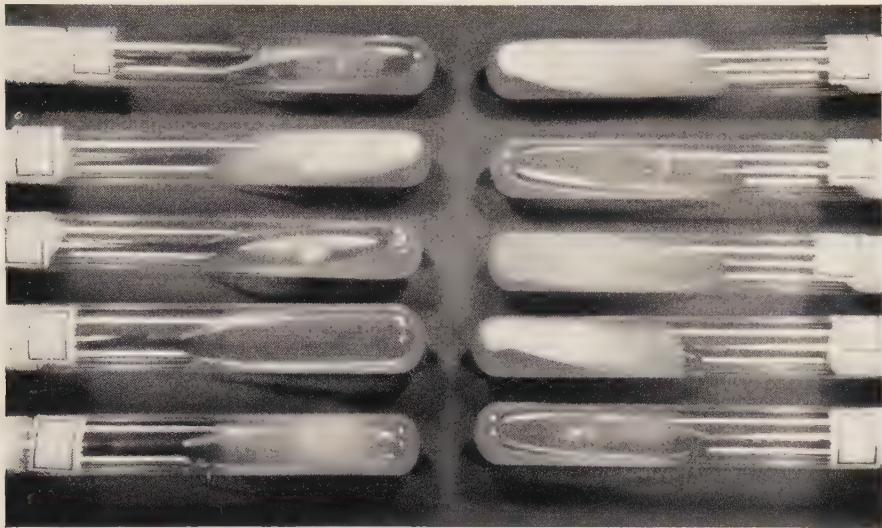


Abb. 1. Malzagarkulturen einiger Stämme von *Polyporus annosus* Fr. nach 14 Tagen Kulturzeit

Tabelle 1

Radiuszuwachs in mm auf Malzagarplatten bei + 2 ° C

Pilzstamm Nr.	Tage								
	2	4	6	8	10	12	14	19	75
1	0,5	3,5	8	10	13,5	17,5	21,5	28	43
2							1	2,5	19
3							2,5	4,5	43
4							2	3	43
5						0,5	1,5	3	43
6								1,5	26,5
23: II					2,5	7	10,5	19,5	43
23: III								1	24
23: IV						1	2,5	3	27,5
50: IV							3	7	43
57							5	11,5	—
62			2	3,5	4,5	7	9	12,5	43
77	0,5	2	6,5	9	11,5	14,5	19	24,5	43
G 1						0,5	5	9	43
G 5			2	5,5	10	15	19,5	27	43
G 8								1,5	16
G 9							1	2	—
G 12							2	3	43
LD 1			0,5	0,5	1	2,5	3,5	6	43
LL 1								1	43

4\*

Tabelle 2

Radiuszuwachs in mm auf Malzagarplatten bei + 20° C

Pilz- stamm Nr.	Tage										
	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14	19
1	13,5	23	33,5	43		Spor					
2	1,5	3,5	7	14	18	24	29	37,5	43		
3	2,5	7	14	21,5	27	36	43				
4	2,5	7,5	12,5	21,5	26,5	35	41,5	43			
5	1	6,5	11	18	24	30	36		43		
6	2	2,5	3,5	7	9	16,5	24	36	43		
23: II	7	18	29	43		Spor					
23: III	5	11,5	15	18	26	30	36	43	Spor		
23: IV	7,5	14	21	27,5	34,5	43					
50: IV	12,5	26,5	41,5	43							
57	6	10,5	20	29	33	43					
62	8,5	15	21	33	40,5	43	Spor				
77	11	20,5	30	43		Spor					
G 1	4	16	29,5	43	Spor						
G 5	13,5	26,5	43		Spor						
G 8			0,5	1,5	1,5	2	3,5	5,5	11	14	27,5
G 9	1,5	3	7	15,5	19,5	26	31	43			
G 12	1	4	10,5	18,5	24,5	32,5	43				
LD 1	7,5	18,5	31	43	Spor						
LL 1	1,5	3	9	15	19,5	26	31,5	43			

In diesem groben Test über den Einfluß der Temperatur auf den Zuwachs weisen die verschiedenen Stämme beträchtliche Unterschiede auf. So wächst bei 20° C G 5 aus Småland, Schweden, innerhalb dreier Tage praktisch gleich stark wie G 8 aus Kayzersberg, Frankreich, in 19 Tagen. Zwischen diesen beiden Extremwerten liegen die übrigen Zuwachskurven verteilt. G 5 und G 8 erreichen in + 2° C gleichen Zuwachs nach 12 bzw. 75 Tagen. Wenn man die Form der Zuwachskurven von beiden Stämmen vergleicht, so sind sie einander ähnlich bis auf das bedeutend langsamere Wachstum von G 8. Die Variation innerhalb der Stämme, die aus einer Wirtsart (Kiefer bzw. Fichte) isoliert wurden, ist groß und wenigstens gleich groß wie diejenige zwischen verschiedenen Wirtsarten. So lassen sich auf diesem Wege keine Unterschiede zwischen Stämmen von verschiedenen Wirtsarten festhalten.

Die höchste Temperatur, + 38° C, ist offenbar für den Hauptteil der Stämme letal. Bis zum neunten Tage nach Kulturbeginn konnte kein Zuwachs gefunden werden. Nach dieser Zeit wurden die Petrischalen in + 20° C gebracht. Drei Stämme, Nr. 57, Nr. 62 und G 1, begannen daraufhin zu wachsen und erreichten nach zehn Tagen einen Radius von 30, 20,5 und 23 mm. Entsprechende Zuwachswerte bei Kultur in + 20° C allein werden nach fünf, vier und vier Tagen erreicht. Dies zeigt eine beträchtliche Verzögerung infolge der Hitze.

## Versuch Nr. 2: Qualitative Welkeeffekte.

Zum Studium der toxigenen Welkeeffekte von Stoffwechselprodukten des Pilzes kamen die Stämme Nr. 1 und G 1, die schnell und regelmäßig im Malzagar gewachsen waren, zur Anwendung. Kleine Myzelstücke wurden in 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 40 ml einer modifizierten RICHARDS Lösung eingepflegt. In der einen Versuchsreihe dienten 10,0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , in der anderen 10,0 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  je Liter Lösung als Stickstoffquelle. Die Kolben wurden 17 Tage bei einer Temperatur von  $+ 24^\circ \text{C}$  im Dunkeln inkubiert.

Bei der Ernte des Versuches wurden die Lösungen zweimal filtriert, um ein zellenfreies Filtrat zu erhalten. In je ein Reagenzglas wurde eine 10 bis 15 cm hohe Tomatenpflanze mit unbeschädigten Wurzeln und drei Fiederblättern gesetzt (GENTILE 1951). Die Röhren blieben unter 80 W Kunstlicht stehen, und nach 1, 24 und 48 Stunden wurden die Welkesymptome abgelesen. 16 Pflanzen bildeten eine Versuchsreihe. Als Kontrollen dienten vier Pflanzen in dest. Wasser. Ergebnisse: Nach einer Stunde hatten alle Pflanzen in den Kulturfiltraten die Turgeszenz verloren und hingen schlaff über dem Rohrrand. Die Kontrollen blieben unverändert.



Abb. 2. Welkesymptome an Tomatenpflanzen nach einer Stunde

Nach 24stündiger Beobachtung konnten Unterschiede der Symptome von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Filtraten und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Filtraten festgestellt werden. Die Pflanzen in den  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Filtraten blieben schlaff, während die in den  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Filtraten merkbar an Turgeszenz zurückgewonnen hatten. Zwischen Pflanzen in den Kulturfiltraten des Stammes Nr. 1 und denen von G 1 konnten keine sicheren Unterschiede festgestellt werden.

Nach 48 Stunden zeigen sämtliche Pflanzen, mit Ausnahme der Kontrollen, permanentes toxigenes Welken. Inzwischen treten stärkere Symptome an den Pflanzen, die im Kulturfiltrat des Pilzstammes Nr. 1 gewachsen waren, auf. Das toxigene Welken dieses Endstadiums ist durch eingeschrumpfte Fiederblätter und Rillen am Stengel charakterisiert. Jedoch konnte keine Verfärbung beobachtet werden.

In einem ergänzenden Versuch wurden die beiden Stämme Nr. 1 und G 5 auf RICHARDS Nährlösung geimpft und 13 Tage im Dunkeln bei  $+ 24^\circ \text{C}$  kultiviert. Die toxischen Wirkungen einer Konzentrationsserie von 1,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,



$1/10$ ,  $1/100$  und  $1/1000$  der Stärke in den Ausgangslösungen wurden aufgenommen. Je zwei 10 cm hohe Tomatenschnittpflanzen mit drei Fiederblättern wurden je Konzentration benutzt. Zwölf Kontrollpflanzen standen in dest. Wasser unter denselben Lichtverhältnissen wie im vorigen Versuch.

Beobachtungen nach zehn Minuten zeigten, daß die Pflanzen in Konzentration 1 schnell die Turgeszenz verloren, unabhängig davon, ob die Pflanzen im Filtrat des Pilzstammes Nr. 1 oder G 5 standen.



Abb. 3 (oben). Welkesymptome an Tomatenpflanzen nach 24 Stunden in Kulturfiltraten folgender Konzentrationen (von links): 1,  $1/2$ ,  $1/5$ ,  $1/10$ ,  $1/100$  und  $1/1000$

Abb. 4 (unten). Das Welken derselben Pflanzen wie in Abb. 3 nach 48 Stunden

Nach 24 und 48 Stunden war ein Zustand permanenten Welkens bei Konzentration 1 eingetreten. Dieselben Symptome, doch abgeschwächt, waren in der Konzentration  $1/2$  aufgetreten. In den übrigen Konzentrationenprägten sich die Symptome zu schwach aus, um eine vergleichende Beurteilung zu gestatten. Das Welken ist in Abb. 3 und 4 illustriert.

### Versuch Nr. 3: Zuwachs in verschiedenen Nährlösungen.

Um den Verlauf der Zuwachskurven von vier Stämmen des *Polyporus annosus* Fr. näher zu studieren, wurden Myzelstücke von Nr. 62, HG, SO und OS in folgende Nährlösung eingepft: RICHARD, RAULIN und CZAPEK-Dox. Die Stämme lassen sich folgendermaßen beschreiben:

Pilzstamm	Herkunft	Wirtspflanze	Befallsintensität im Feld
62	Åsumtorp, Skåne, Schweden	Kiefer	Stark
HG	Hornsborg, Småland, Schweden	Kiefer	Mittel
SO	Sjöbo, Skåne, Schweden	Fichte	Stark
OS	Örnås, Halland, Schweden	Fichte	Schwach

Je 60 200-ml-Erlenmeyerkolben wurden in fünf Versuchsreihen mit einem Stamm beschickt. Je 20 entfielen auf eine Nährlösung. Die Kolben wurden bei + 25 ° C im Dunkeln inkubiert und nach 5, 10, 15 und 20 Tagen zu je einem Viertel geerntet. Das Myzel wurde abfiltriert und das Gewicht nach obiger Beschreibung bestimmt. Die erhaltenen Trockengewichte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Wachstum von vier Pilzstämmen in verschiedenen Nährlösungen

Pilzstamm Nr.	Kultur- zeit Tage	Myzel mg		
		Nährlösung		
		Richard	Raulin	Czapek-Dox
62	5	12,1	80,7	1,1
	10	17,5	124,1	—
	15	—	—	—
	20	13,7	152,6	1,4
	50	23,9	128,0	2,0
HG	5	3,4	32,1	0,2
	10	15,3	60,5	—
	15	12,7	58,5	0,7
	20	27,6	75,6	1,0
	50	24,6	94,3	1,5
SO	5	4,1	33,8	0,3
	10	4,4	47,2	—
	15	6,8	50,9	0,3
	20	16,4	64,4	0,8
	50	12,4	94,9	0,1
ÖS	5	4,8	36,5	0,2
	10	14,4	62,8	—
	15	5,9	51,3	0,2
	20	30,1	69,9	0,7
	50	17,7	110,9	0,1

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wuchsen alle Stämme zweifellos am besten in RAULINS Nährlösung. Der Pilz wuchs submers in zusammenhängenden Myzelschlingen. Die Lösungen besaßen eine auffallende gelbe Farbe.

In RICHARDS Nährlösung zeigte der Myzeltypus gute Übereinstimmung mit dem der RAULINS Lösung. Das Trockengewicht war jedoch erheblich geringer.

CZAPEK-DOX erzeugte keine zusammenhängenden Myzelschlingen, sondern getrennte Klumpen von Myzel. Eine Gelbfärbung der Lösung konnte nicht wahrgenommen werden.

Vergleicht man die relativen Werte des Zuwachses in den drei Lösungen, ergibt sich das Verhältnis 100 : 20 : 1. Die Zuwachskurven sind graphisch in Abbildung 5 dargestellt.

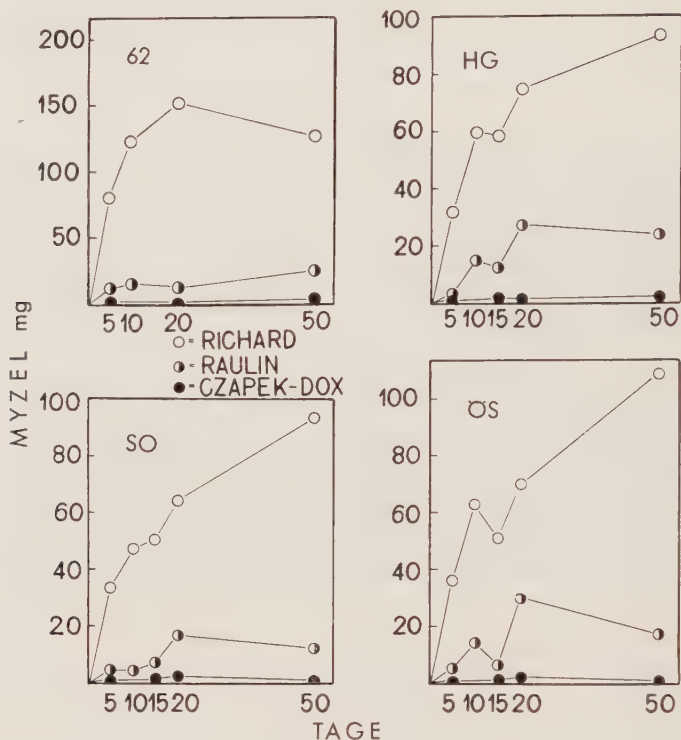


Abb. 5. Myzelwachstum von vier Pilzstämmen in drei verschiedenen Nährlösungen

Ein Vergleich zwischen den von Kiefer bzw. Fichte isolierten Stämmen gibt keine signifikanten Unterschiede. Ein Stamm, Nr. 62, zeigt einen schnelleren „Jugendzuwachs“, aber der Vorsprung wird nach 50tägiger Kulturdauer beinahe vollständig von den anderen Stämmen eingeholt. Schließlich scheint keine Korrelation zwischen dem Zuwachs der Pilzstämme im Versuch und der Befallsintensität im Wald vorzuliegen.

#### Versuch Nr. 4:

RAULINS Nährlösung zeichnet sich von den beiden anderen verwendeten durch einen Gehalt an Weinsäure und das reichliche Vorkommen von Ammoniumnitrat aus. Um eine Vorstellung von der Bedeutung der Weinsäure und des Ammoniumnitrates für Wachstum und Toxinbildung zu bekommen, wurde in zwei Serien von 100-ml-Kolben mit 40 ml RAULINS Nährlösung der Pilzstamm Nr. 62 geimpft. In der einen Serie wurde der Ammoniumnitratspiegel folgendermaßen variiert: 1,0, 2,7, 4,0, 6,0 und 8,0 g/l Lösung. Der Weinsäurespiegel blieb mit 2,7 g/l konstant. Die andere Serie enthielt



Tabelle 4

Myzelwachstum in Nährlösungen, in welchen die Konzentrationen von Weinsäure und Ammoniumnitrat variiert sind  
 2,7 g Weinsäure / 1. Lösung

Myzelgewicht in mg

End-pH	Daneben zugeführtes $\text{NH}_4\text{NO}_3$ g/l				
	1,0	2,7	4,0	6,0	8,0
2,3	$92,2 \pm 2,3$	$82,5 \pm 0,6$	$83,8 \pm 2,1$	$77,9 \pm 1,6$	$71,4 \pm 5,6$
2,3					
2,3					
2,3					
2,3					

2,7 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  / 1. Lösung

End-pH	Daneben zugeführte Weinsäure g/l				
	1,0	2,7	4,0	6,0	8,0
2,5	$89,7 \pm 3,4$	$84,5 \pm 2,6$	$74,0 \pm 0,8$	$53,2 \pm 1,7$	$48,5 \pm 1,6$
2,3					
2,2					
2,3					
2,2					

folgende Konzentrationen Weinsäure: 1,0, 2,7, 4,0, 6,0 und 8,0 g/l. Diesmal blieb die Ammoniumnitratkonzentration mit 2,7 g/l konstant. Jede Konzentration war mit fünf Kolben vertreten. Nach 20tägiger Standkultur bei  $+24^\circ\text{C}$  im Dunkeln erfolgte die Ernte. Die Trockengewichte des Myzels sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Bei den verwendeten höheren Konzentrationen zeigt der Zuwachs sinkende Werte mit steigendem Zusatz von Weinsäure bzw. Ammoniumnitrat.

Die Trockengewichte sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Die Weinsäure bedingt eine Variationsbreite im Zuwachs, die diejenige von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mit 100 % übertrifft. Offenbar ist bei den verwendeten Konzentrationen von Weinsäure und Ammoniumnitrat das Optimum nicht getroffen, sondern nur der absteigende Ast einer Optimumkurve.

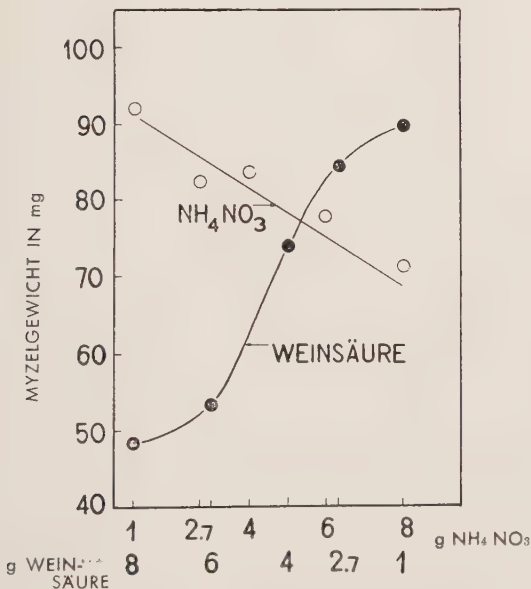


Abb. 6. Myzelertrag in Nährlösungen mit variierten Konzentrationen Ammoniumnitrat bzw. Weinsäure

Um numerische Werte der antibiotischen Aktivität der Lösungen zu bekommen, wurden diese auf die Bakterienarten ETH 2072, ETH 2018 und Lund 2515 nach der früher beschriebenen Plattenmethode getestet.

Mit der Möglichkeit vor Augen, daß Weinsäure an und für sich auf Bakterien hemmend wirken kann, da sich diese oft am besten in neutralen oder schwach alkalischen Lösungen entwickeln (RIPPEL-BALDES S. 148, BIGGER S. 45), wurde ein Test mit Weinsäure in dest. Wasser vorgenommen. Die Konzentrationen übersteigen wesentlich die der Nährlösungen. Die Ergebnisse der beiden Bakterienteste sind in Tabelle 5 eingetragen.

Tabelle 5

Wachstumshemmung von drei Bakterienarten durch Kulturfiltrate (5:1 konzentriert) und durch Weinsäure

Nr.	Weinsäure g/l	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> g/l	Hemmung mm Ø		
			Bakterium		
			ETH 2072	Lund 2515	ETH 2018
1		1,0	13,5	16,5	13,0
2		2,7	13,5	16,0	13,0
3		4,0	13,0	15,0	11,0
4		6,0	14,3	14,0	11,0
5		8,0	14,3	15,0	11,0
6	1,0		8,0	8,5	8,0
7	2,7		13,5	14,0	10,0
8	4,0		16,5	16,0	13,5
9	6,0		18,0	17,0	20,0
10	8,0		19,0	18,0	21,0
Weinsäure- Test	10		8,0	10,0	9,0
	20		13,0	15,0	16,0
	40		15,0	19,0	19,0
	80		22,0	23,0	29,0
	160		27,0	28,0	33,0

Daraus geht hervor, daß die antibiotische Aktivität in fermentierter Nährlösung nur in geringem Maß auf die Weinsäure zurückgeführt werden kann. Die Säure scheint dieselbe stimulierende Wirkung auf die Bildung des antibiotischen Stoffes auszuüben wie organische Säuren bei anderen Pilzen (JARVIS und JOHNSON 1947, ÖBLOM 1951).

So bekommt man in fermentierter Lösung mit 8,0 g Weinsäure je Liter Hemmzonen von 17, 19 und 21 mm Durchmesser, während eine Konzentration von 10 g Weinsäure in dest. Wasser Hemmzonen von 8, 8,5 und 10 mm Durchmesser gibt.

Die Bedeutung des Ammoniumnitrates für die antibiotische Aktivität im Kulturfiltrat geht nicht in derselben eindeutigen Weise wie in der Weinsäureserie aus dem Bakterientest hervor. Die numerischen Differenzen sind gering, und nur für das Bakterium ETH 2018 kann eine sinkende antibakte-

rielle Aktivität mit steigender Ammoniumnitratkonzentration festgelegt werden.

### Versuch Nr. 5: Zuwachs und Toxinbildung in variiert Weinsäure- und Ammoniumnitratkonzentration.

Als eine Fortsetzung des vorigen Versuchs wurde ein analoger Versuch mit der Absicht, die Zuwachskurven bei Konzentrationen von 0, 0,1, 0,5, 1,0 und 10,0 g Weinsäure und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  je Liter Lösung näher zu studieren, angelegt. Nach 22 Tagen Standkultur bei  $+24^\circ\text{C}$  wurden fünf Kolben je Konzentration geerntet und wie im vorigem Versuch analysiert.

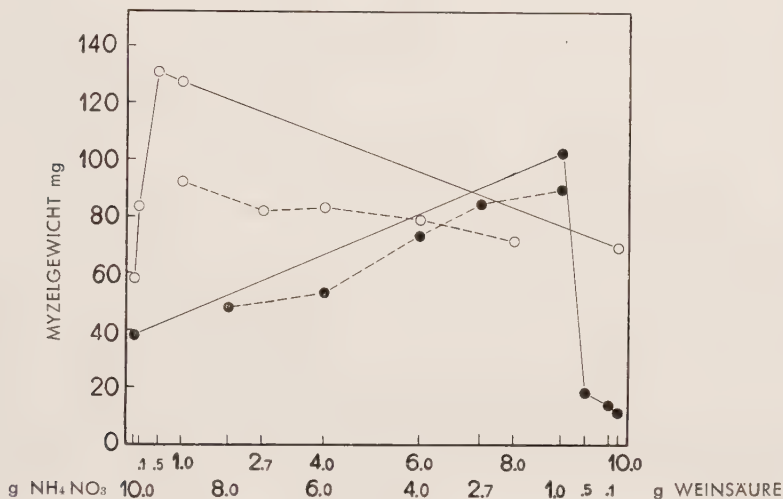


Abb. 7. Myzelzuwachs in Nährlösungen mit variierten Konzentrationen Ammoniumnitrat bzw. Weinsäure. ●Weinsäure ○ $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Der Zuwachs ist in Abbildung 7 angegeben, wo auch die Myzelgewichte vom vorigen Versuch eingetragen sind.

Es geht daraus hervor, daß eine gute Übereinstimmung im Wachstum bei höheren Konzentrationen Weinsäure und Ammoniumnitrat in den beiden Versuchen vorliegt. Die höherliegenden absoluten Myzelgewichte in Versuch 5 können der längeren Kulturzeit zugeschrieben werden. Bei niedrigeren Konzentrationen Weinsäure erweist sich die Annahme, daß schon 1,0 g/l Lösung optimal für das Pilzwachstum ist, als korrekt. Ein maximaler Zuwachs ist mit 0,5 g/l zu erhalten. Bei konstantem Weinsäurespiegel bekommt man den höchsten Ertrag mit 1,0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  je Liter Lösung. Zwischen 0,5 und 1,0 g/l zeigt die Kurve einen erheblichen Anstieg und fällt bei höheren Konzentrationen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  wieder ab. Die Resultate gleichen denen von LEONIAN und LILLY (1940) bei *Phycomyces*. Allerdings arbeiteten diese Autoren nur in dem Konzentrationsbereich mit steigendem Ertrag. Der Test des auf 5:1 konzentrierten Toxines wurde mit dem Bakterium ETH 2072 ausgeführt und gab die Hemmzonen der Tabelle 6.



Tabelle 6

Myzelzuwachs, pH-Veränderungen und Bakterienhemmung  
bei verschiedenen Konzentrationen von Weinsäure  
und Ammoniumnitrat

Weinsäure g/l Lösung	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> g/l Lösung	End-pH	Myzelgewicht mg	Hemmzonen mm Ø	
				Bakt. ETH 2072	
				Filtrat	Kontrolle
0		2,8	58,1 ± 0,8	10,6	±
0,1		2,8	85,3 ± 2,2	11,2	±
0,5		2,9	131,2 ± 3,9	10,4	±
1,0		2,3	127,7 ± 3,8	12,1	±
10,0		2,4	69,8 ± 4,4	12,7	±
	0	7,0	12,3 ± 0,5	0	0
	0,1	6,8	13,8 ± 0,3	0	0
	0,5	5,0	17,1 ± 1,3	0	0
	1,0	2,6	103,3 ± 6,6	9,5	0
	10,0	2,1	38,3 ± 2,9	20,5	19,5

In der Weinsäureserie tritt eine Hemmung des Bakterienwachstums in allen Konzentrationen auf, während dies in der NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Serie nur bei einer Konzentration von 1,0 g/l der Fall ist. Die kräftige Hemmung der Konzentration 10,0 g/l wird von der Kontrolle bis auf einen Millimeter erreicht. Die pH-Werte in der Ammoniumnitratserie zeigen am Ende der Versuchszeit große Variationen. In der Weinsäureserie ist die Variation erheblich geringer und schwankt nur von 2,9 bis 2,3.

Versuch Nr. 6 : Zuwachs und Toxinbildung in Nährlösungen ohne Weinsäure.

Nachdem in den früheren Versuchen das Pilzwachstum in den drei synthetischen Nährlösungen RICHARD, RAULIN und CZAPEK-DOX und in diesem Zusammenhang die Einwirkung von Weinsäure und Ammoniumnitrat auf den Zuwachs des Pilzes und die antibiotische Aktivität des Kulturfiltrates studiert worden war, wurde der Zuwachs in einigen Nährlösungen ohne Weinsäure verfolgt:

- a) TUBEUF,
- b) RICHARD 5,
- c) Corn Steep Liquor,
- d) BARNE,
- e) Glykokoll,
- f) Buchenspäne.

In einem vorbereitenden Versuch wurde der Pilzstamm Nr. 62 nach der Sporensuspension-Methode in 150 ml RAULINS Nährlösung geimpft und in Schüttelkultur bei + 27 ° C (oszillierend mit 100 Doppelschlägen Minute)

versetzt. Jeden Tag wurden zwei Kolben herausgenommen, das Myzelgewicht bestimmt und die antibakterielle Aktivität in konzentriertem Kulturfiltrat getestet. Das Bakterium ETH 2018 diente als Testorganismus.

Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, wird der Myzelantrag bedeutend größer als in entsprechender Zeit bei Standkultur. Die antibiotische Aktivität steigt mit zunehmender Myzelproduktion bis zum fünften Tage. Danach zeigt jede Abnahme der Zuwachskurve eine verstärkte Toxinwirkung, während eine gesteigerte Myzelproduktion von einer markanten Abnahme der toxischen Aktivität begleitet ist.

Nachdem diese Erfahrungen gewonnen waren, kam in diesem Versuch das Schüttelkulturverfahren zur Anwendung. 100 ml Nährlösung wurden mit Sporensuspensionen des Pilzstammes Nr. 62 in 500-ml-Kolben geimpft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammen mit den pH-Werten eingetragen.

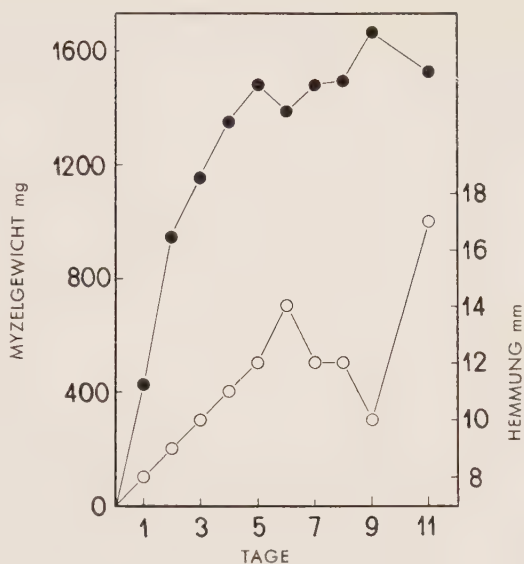


Abb. 8. Myzelwachstum und Toxinaktivität in Schüttelkultur

Tabelle 7

Myzelzuwachs in verschiedenen Nährlösungen ohne Weinsäure

Nähr-Lösung	Anfangs-pH	4 Tage		8 Tage		12 Tage		24 Tage	
		End-pH	Myzel-gewicht mg	End-pH	Myzel-gewicht mg	End-pH	Myzel-gewicht mg	End-pH	Myzel-gewicht mg
a	2,9	3,1	5,9	2,6	9,1	3,1	5,6	3,3	18,6
b	4,1	2,7	244,9	1,9	315,5	2,4	318,1	2,5	317,9
c	4,0	7,9	1650,4	8,2	1715,1	8,7	1529,0	8,1	1178,9
d	4,6	3,5	37,7	2,9	39,6	3,4	36,2	3,4	48,8
e	4,1	4,7	5,4	4,8	10,7	5,6	12,3	6,0	19,3
f	4,0	5,8	556,9	7,4	582,7	7,9	—	8,0	—

Der durchaus beste Zuwachs findet in Nährlösung c statt, in der nach acht Tagen ein Optimum erreicht ist. Danach nehmen die Werte ab. Ein bedeutender Zuwachs ergibt sich in der Lösung f, „Buchenspäne“. Das Myzel hat jedoch die Neigung, in die stark zerkleinerten Buchenspäne einzudringen, und so konnte es nach 12 und 24 Tagen Kulturdauer nicht gewogen werden.

Die Nährlösung b, RICHARD 5, gab auch einen beträchtlichen Zuwachs mit einem sehr flachen Optimum. Die übrigen drei verwendeten Nährlösungen gaben bescheidene Erträge, wahrscheinlich durch den Mangel an geeigneten Kohlenstoffquellen bedingt.

Die Toxinproduktion wurde am qualitativen Tomatentest in Konzentrationen 1 : 0 und 1 : 5 der Kulturfiltrate geprüft. Tabelle 8 gibt eine Übersicht über das Welken der Testpflanzen.

Tabelle 8

Welkeeffekte im qualitativen Tomatentest mit Nährlösungen ohne Weinsäure

Kulturzeit Tage	Konzentration	Nährlösung											
		a		b		c		d		e		f	
		Blatt	Stengel	Blatt	Stengel	Blatt	Stengel	Blatt	Stengel	Blatt	Stengel	Blatt	Stengel
4	1:0	2	3,5	1,5	3,5	3	3	0,5	0	1,5	4	1,5	2
	1:5	1	2	1	1	1,5	1,5	0,5	0	1,5	1	0,5	1,5
8	1:0	4	4	2	2	2	2	0	0,5	3	3	0,5	1
	1:5	2	1	1	0,5	±	1	0	0	±	0	±	1,5
12	1:0	4	4	3	3	2	1,5	1,5	±	3	2,5	4	±
	1:5	1	±	1	0	1	±	1,5	0	2	1	2	±
24	1:0	4	2	3	3,5	2	±	2	0	4	4	3	1
	1:5	1	0	±	0	1,5	±	±	0	1	±	2	±

Tomatenpflanzen wurden als Testobjekte gewählt, da die pH-Werte im Kulturfiltrat sehr wechselnd waren und die zur Verfügung stehenden Bakterien sich pH-empfindlich gezeigt hatten. Aus der Tabelle geht hervor, daß nur eine sehr schwache Korrelation zwischen Zuwachs und Toxinproduktion vorliegt.

Versuch Nr. 7: Zuwachs und quantitative Toxinbildung in RAULINS modifizierter Nährlösung.

Um den Zuwachsrhythmus eines schnellwachsenden Stammes von *Polyporus annosus* etwas eingehender zu untersuchen, wurde Nr. 62 gewählt. Der Versuch dauerte 32 Tage, und alle zwei Tage wurden vier Kolben geerntet. Daneben durfte der Inhalt von vier Kolben während 60 Tagen weiterwachsen, wonach die Analyse stattfand. Das Myzel wurde in Standkultur bei + 25 ° C im Dunkeln gezüchtet. 45 ml modifizierte RAULIN-Lösung wurden mit kleinen Myzelstücken in Erlenmeyerkolben beimpft. Eine Isolierung und Extraktion von Rohtoxin aus den Kulturfiltraten wurde nach der Beschreibung von ROBBINS et al. (1947) zur Gewinnung von Biformin und Biforminsäure aus dem Basidiomyceten *Polyporus biformis* vorgenommen. Ihre Methode war folgende: „Isolation: Fermented liquor boiled 10 minutes at pH 6.5, extracted twice with chloroform, evaporated with addition of water to a turbid, brown, aqueous concentrate and filtered.“ Das Rohtoxin wurde



gewogen, und die Gewichte sind zusammen mit der Myzelproduktion und den pH-Werten in Tabelle 9 eingetragen.

Tabelle 9

Myzelzuwachs und Bildung von Rohtoxin mit Berücksichtigung der Kulturzeit

Kulturzeit Tage	Anfangs- pH	End- pH	Myzelgewicht in mg	Rohtoxin mg	Anmerkung
4	3,1	3,0	31,7 $\pm$ 5,0	70,8	
6	3,1	2,4	64,7 $\pm$ 9,0	279,4	
8	3,1	2,3	71,0 $\pm$ 14,0	387,1	
10	3,1	2,3	112,4 $\pm$ 10,0	288,0	
12	3,1	2,6	127,8 $\pm$ 1,0	404,5	
14	3,1	2,6	129,2 $\pm$ 6,0	349,1	
16	3,1	2,1	139,1 $\pm$ 2,0	470,7	
18	3,1	2,2	132,3 $\pm$ 9,0	505,0	
20	3,1	2,2	130,8 $\pm$ 7,0	684,4	
22	3,1	2,2	151,8 $\pm$ 2,0	651,4	
24	3,1	2,2	131,0 $\pm$ 6,0	540,4	
26	3,1	2,0	147,9 $\pm$ 2,0	687,8	
28	3,1	2,2	152,6 $\pm$ 14,0	692,4	
30	3,1	2,1	139,0 $\pm$ 5,0	1019,6	
32	3,1	2,1	143,2 $\pm$ —	879,6 Korrr.	2 Kolben
60	3,1	1,9	133,6 $\pm$ 4,0	328,4 Korrr.	3 Kolben

Der Versuch zeigt mit großer Deutlichkeit, daß mit zunehmender Kulturzeit die Lösungen stärker sauer werden. Der pH 3,1 der Ausgangslösungen sank nach 30 Tagen auf 2,1, nach 60 Tagen auf 1,9. Nach LAGERBERG (1923), WEIS und NIELSEN (1927) liegt der pH-Wert für optimalen Zuwachs von *Polyporus annosus* zwischen 4 bis 6. Sie fanden auch einen schnellen Abfall der pH-Werte während einer Kulturzeit von 14 Tagen. TRESCHOW (1938) konnte seinerseits keinen pH-Bereich finden, der für den Zuwachs optimal war, sondern meint, daß der Pilz im pH-Bereich 2,9 bis 5,2 gleich gut wächst, wenn die Nährlösung im Überschuß vorliegt. Unter pH 2,9 und über 7,0 findet er überhaupt keinen Zuwachs. Er folgert hieraus, daß der Pilz ziemlich pH-tolerant und imstande ist, auf seinem natürlichen Substrat den pH-Wert selbst zu regulieren. Die schnell erfolgenden pH-Verschiebungen im Versuch deuten auf dieselbe Fähigkeit des Pilzes in synthetischen Nährlösungen. RENNERFELT (1952) findet optimalen Zuwachs im pH-Bereich 4,5 bis 5,5.

Myzelgewichte und Rohtoxinproduktion sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

Die Zuwachskurve des Pilzes besitzt im Prinzip dasselbe Aussehen wie im Versuch 3. Die schwache, aber gesicherte Abnahme bei 50tägiger Kulturzeit im obengenannten Versuch hat sich in diesem bestätigt. Die Kurve hat das Aussehen einer flachen Optimumkurve. Die Werte zeigen geringe Streuung. Die Menge produzierten Rohtoxines steigt mit zunehmender Myzel-

produktion. KOBEL (1951) zeigte, daß die Aktivitätskurven des Kulturfiltrates von *Nectria cinnabarina* eine kleine Verzögerung gegenüber denen des Myzelwachstums aufweisen. SAUTHOFF (1955) fand, daß die Maxima der Toxin- und Myzelproduktion bei *Botrytis cinerea* übereinstimmten. TUREL (1952) gibt zusammenfallende Maxima für Myzelwachstum und toxische Aktivität für 14tägige Kulturzeit bei *Fusarium solani* an.

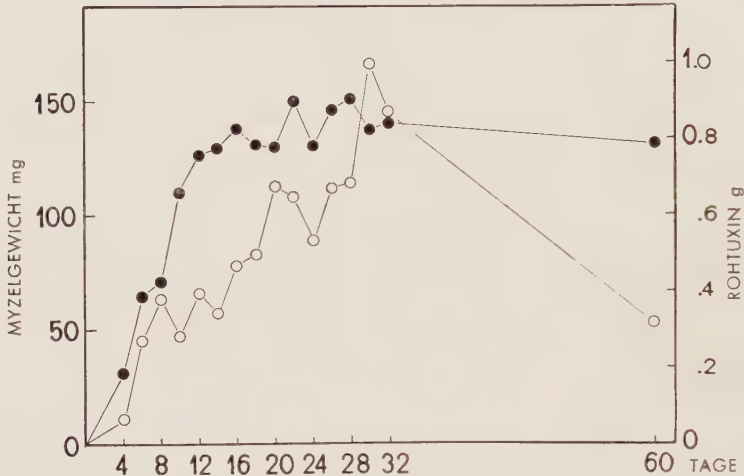


Abb. 9. Myzelzuwachs und Toxinbildung in Standkultur. ● Myzel ○ Toxin

Versuch Nr. 8: Analyse von Zucker, Weinsäure, pH-Werte, Myzelgewichte und toxische Aktivität des Kulturfiltrates.

Im vorigen Versuch wurde mittels Wägen eine Korrelation zwischen Myzelwachstum und produziertem Rohtoxin erhalten. Um weitere Zusammenhänge zu studieren, wurde bei jeder Ernte der Kulturkolben die Menge Zucker, die Menge Weinsäure, die pH-Werte, das Trockengewicht des Myzels und die Aktivität des Toxines festgelegt. Der Pilzstamm Nr. 62 wurde in 40 ml RAULINS mod. Nährlösung eingepflegt und als Standkultur bei  $+ 24^{\circ} \text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Alle zwei Tage wurden vier zufällig gewählte Kolben geerntet. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Was die pH-Werte betrifft, so steigt die Ansäuerung mit zunehmender Kulturzeit. Ausnahmen, die von zufälligen Störungen abhängen können, sind nach 14, 16 und 52 Tagen Fermentieren aufgetreten. Wenn man die Myzelgewichte beobachtet, zeigen die Ernten bis zum sechsten Tage ziemlich große Mittelfehler, die später abnehmen und eine statistische Sicherung der Werte erlauben. Eine starke Abnahme des Zuwachses nach 14 und 16 Tagen Kulturzeit ist beobachtet. Nach 18 Tagen tritt ein zweites Gewichtsoptimum auf. Dann setzt die autolytische Phase ein.

Der Zuckerabbau steigt mit zunehmendem Myzelwachstum, setzt sich aber auch nach dem Zuwachsoptimum fort. Die Analyse nach 30 Tagen ergibt nur 0,6 g/l, während die Ausgangslösung 46,6 g/l Zucker enthielt. KOBEL (1951) berichtet für den Zuckerverbrauch von *Nectria cinnabarina* grundsätzlich

Tabelle 10

Myzelzuwachs, pH-Werte, Zucker- und Weinsäureabbau  
sowie toxische Aktivität der Kulturfiltrate  
von dem Pilzstamm Nr. 62

Kulturzeit Tage	End-pH	Myzelgewicht mg	Zuckerrest g/l	Weinsäurerest g/l	Toxin-Aktivität							
					Hemmung mm Ø Bakt.			Qual. Tomatentest Konzentration				
					2072	2515	2018	1:0		1:5		
								Blatt	Stengel	Blatt	Stengel	
2	3,2	5,05 ± 1,3	43,0	3,07	0	7,5	7,0	1	2	0	1	
4	2,8	51,6 ± 5,4	31,2	3,09	9,5	8,8	8,3	1	3	±	0	
6	2,7	84,1 ± 14,9	20,1	3,03	9,5	8,8	7,7	1	1	0,5	±	
8	2,6	103,7 ± 7,4	17,0	2,19	12,5	10,7	8,3	1	1	0	±	
10	2,6	120,8 ± 9,9	8,0	2,13	12,0	10,3	9,0	0,5	3	0	0	
12	2,5	141,8 ± 1,5	8,0	2,08	12,5	11,4	9,5	1	2	±	±	
14	3,0	123,3 ± 9,1	4,8	2,12	10,0	9,4	8,7	0	2	±	0	
16	2,9	118,5 ± 2,9	2,5	2,05	10,5	9,1	9,2	1	1,5	±	0	
18	2,4	130,2 ± 2,3	3,0	2,08	13,0	12,4	10,3	2	1,5	±	0	
20	2,7	116,4 ± 2,2	2,0	2,11	11,0	10,4	9,7	2	1	0,5	0	
22	2,3	121,9 ± 2,6	0,9	2,14	12,0	10,6	10,8	1	1	0,5	0	
30	2,4	119,0 ± 2,4	0,6	2,07	10,0	9,8	11,5	2	2	±	±	
52	3,4	122,7 ± 2,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

dasselbe Verhältnis. STALDER (1954) gibt für *Botrytis cinerea* an, daß in fermentierten Nährlösungen mit Weinsäure die Glukose nach 14 Tagen ganz abgebaut ist. STOLL (1954) zeigte in seinen Untersuchungen über *Gibberella fujikuroi*, daß die Glukose schon nach elf Tagen abgebaut ist. Ein maximaler Myzelzuwachs wird aber erst nach 20 bis 25 Tagen erreicht.

Die Weinsäurekonzentration bleibt bis zum achten Tage stabil. Dann tritt ein plötzlicher Rückgang auf ein Niveau, das bis zum Versuchsende erhalten bleibt, ein. Die angegebenen Werte sind nur als relativ anzusehen.

Stellt man die toxische Aktivität und die pH-Werte graphisch dar, findet man eine bedeutende Übereinstimmung. Je saurer das Kulturfiltrat ist, desto größer ist die antibiotische Aktivität im Bakterientest, wie das aus Abbildung 10 hervorgeht.

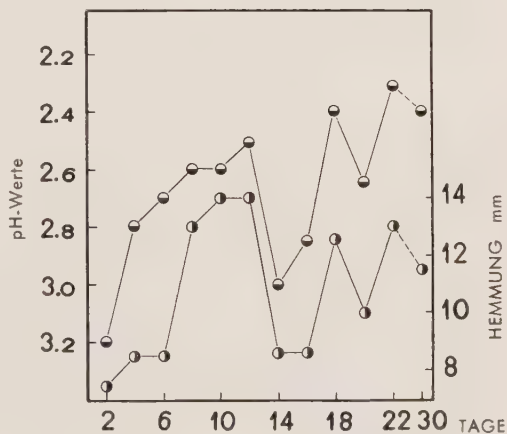


Abb. 10. Die Variation der pH-Werte mit der Kulturzeit und die bakterienhemmende Wirkung der auf 5 : 1 konzentrierten Kulturfiltrate

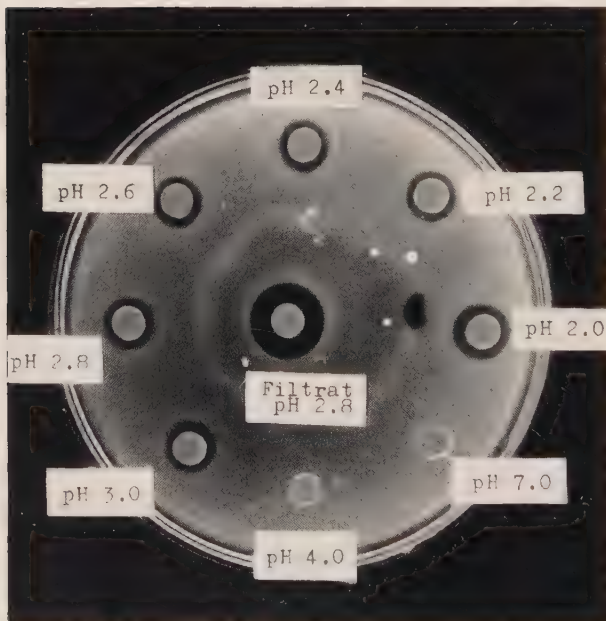


Um festzustellen, ob dieser Effekt nur ein pH-Effekt ist, oder auch auf einer synergistischen Wirkung beruht, wurde eine pH-Serie in dest. Wasser mit den Bakterien ETH 2072, ETH 2018 und Lund 2515 angelegt. Als Vergleichssubstanz diente Kulturfiltrat des Versuches mit pH 2,6 und 2,4, d. h. nach 8 bzw. 18 Tagen Kulturzeit.

Tabelle 11

pH-Empfindlichkeit der benutzten Bakterien  
und die antibiotische Aktivität einiger Kulturfiltrate

Kulturzeit Tage	pH- Werte	Hemmung mm $\varnothing$ Bakterium			Flächenverhältnis der Hemmungszone				
		ETH 2072	Lund 2515	ETH 2018	Bakt.	Kultur- filtrat pH 2,6	Kontr. pH 2,6	Kultur- filtrat pH 2,4	Kontr. pH 2,4
	2,0	10,8	10,5	8,8					
	2,2	10,8	9,5	8,3	2072	151	100	179	100
	2,4	10,5	9,8	8,3	2515	127	100	217	100
	2,6	9,8	9,3	7,8	2018	134	100	180	100
	2,8	9,3	8,3	7,5					
	3,0	8,5	7,8	$\pm$					
	4,0	0	0	0					
	7,0	0	0	0					
8	2,6	12,0	10,5	9,0					
18	2,4	14,0	14,5	11,0					



In Tabelle 11 ist das pH-Spektrum der drei Bakterienarten als Größe der Hemmzone dargestellt. Die benutzten Bakterien zeigen eine große Empfindlichkeit gegen hohe Konzentrationen von Wasserstoffionen. Im Kulturfiltrat mit entsprechendem pH-Wert sind die Hemmzone

Abb. 11. pH-Empfindlichkeit der Bakterien ETH 2018. Im Zentrum der Platte Kulturfiltrat von pH 2,8

ohne Ausnahme erheblich größer. In einem Fall ist das Verhältnis sogar 217 : 100. Im sauren Milieu gibt es also ein wirksames Prinzip, das neben dem pH antibakteriell wirkt (Abb. 11 u. 12).

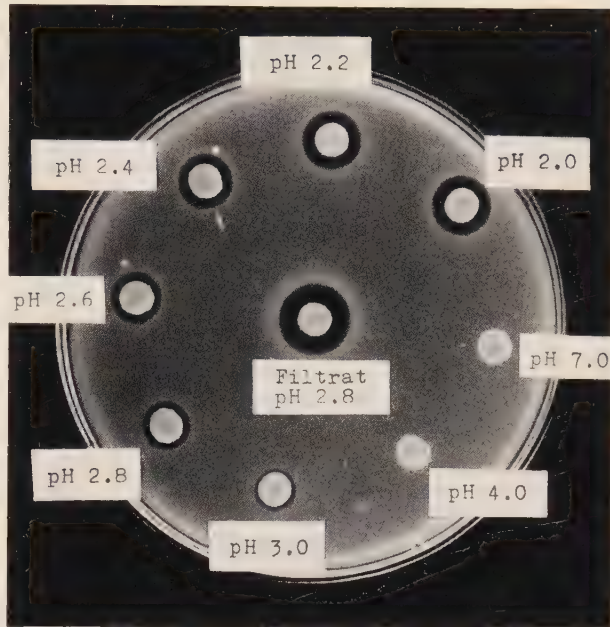


Abb. 12. pH-Empfindlichkeit der Bakterien Lund 2515. Im Zentrum der Platte Kulturfiltrat von pH 2,8

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der Zucker- und Weinsäureverbrauch bedeutend ist und mit der großen Wachstumsphase des Pilzes parallel läuft, um später während der stationären Wachstumsphase abzunehmen. Zuwachs, pH-Werte und toxische Aktivität sind nachweisbar korreliert. Die antibiotische Aktivität ist stark vom pH-Wert abhängig. Darüber hinaus besitzt eine Substanz aus dem Stoffwechsel des Pilzes bedeutende toxische Aktivität. Zwei Kulturfiltrate mit pH 2,6 und 2,4 wurden alkalisch (pH 8,0) gemacht. Die antibiotische Aktivität fiel dadurch so stark ab, daß keine eigentliche Hemmung, sondern nur ein geschwächter Zuwachs der Bakterien auftrat.

#### Versuch Nr. 9: Einwirkung des pH.

In den beiden vorigen Versuchen sind die End-pH-Werte der Nährlösungen im Zusammenhang mit dem Pilzzuwachs und der Toxinproduktion berücksichtigt worden. Ergänzend wurde die Abhängigkeit des Zuwachses und des End-pH-Wertes vom Ausgangs-pH untersucht. Die Stämme Nr. 62 und SO wurden in mod. RAULINS Nährlösung eingepflegt und bei + 24° C im Dunkeln inkubiert. Nach 10 und 30 Tagen fand die Ernte je zweier Kolben jedes Pilzstammes statt. Die gepufferte Serie umfaßte einen Ausgangs-pH von 8,0, 6,0, 4,0, 3,0 und eine ungepufferte Kontrolle mit dem pH-Wert 3,1. Die Einstellung des pH erfolgte mit steriler n NaOH oder n KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> nach dem Autoklavieren. Isolierung und Extraktion geschah nach der im Versuch 7 beschriebenen Methode. Die Resultate der Analyse liefert Tabelle 12.

Die Fähigkeit beider Pilzstämme 62 und SO, die pH-Werte der Lösungen schnell in saurer Richtung zu verschieben, ist auffallend. Die Abnahme

Tabelle 12

Zuwachs und Toxinbildung von zwei Pilzstämmen  
bei verschiedenen pH-Werten

Pilzstamm	Kulturzeit Tage	Anfangs- pH	End- pH	Myzelgewicht mg	Rohtoxin mg
62	10	8	3,7	285,5	59,9
	30	8	4,0	287,2	112,2
	10	6	3,4	318,8	7,0
	30	6	3,5	341,5	203,2
	10	4	2,8	306,1	32,9
	30	4	2,6	342,8	274,9
	10	3	—	—	—
	30	3	2,3	204,7	183,2
	10	Kontr.	2,7	174,8	38,4
	30	Kontr.	2,2	235,4	235,6
SO	10	8	3,8	321,0	28,7
	30	8	4,2	352,5	300,6
	10	6	3,4	293,6	150,0
	30	6	3,8	340,9	157,5
	10	4	2,9	255,8	25,0
	30	4	2,6	293,0	452,3
	10	3	2,8	101,7	27,1
	30	3	2,3	185,9	413,5
	10	Kontr.	2,7	124,2	41,9
	30	Kontr.	2,3	162,8	390,3

ist in den basischen Lösungen am größten, aber auch in so stark sauren Ausgangslösungen wie pH 3,0 wird das End-pH noch niedriger. Der Zusammenhang zwischen Zuwachs und Wasserstoffionenkonzentration ergibt zwischen dem von Kiefer isolierten Pilzstamm Nr. 62 und dem von Fichte rein gezüchteten SO Unterschiede. So stimmen die Ergebnisse des Stammes 62 mit den Erfahrungen RENNERFELTS (1952) überein, daß maximaler Zuwachs im pH-Bereich 4,5 bis 5,5 zu erhalten ist. Niedrigere Ausgangs-pH-Werte als 4,0 und höhere als 6,0 geben geringeren Ertrag. Für den Stamm SO folgt das Myzelgewicht den steigenden pH-Werten mit einer maximalen Produktion bei pH 8,0 und einer minimalen bei pH 3,0. Die Zuwachswerte der Kontrollen mit pH 3,1 stimmen mit denen bei pH 3,0 gut überein.

Die Werte des extrahierten Rohtoxines zeigen keinerlei Abhängigkeit von den Zuwachskurven oder pH-Werten. Einzig besteht die allgemeine Tendenz, daß in allen Kulturen die Gesamtmenge Rohtoxin mit zunehmender Kulturzeit steigt.

#### Versuch Nr. 10: Einwirkung von Aminosäuren.

In früheren Versuchen ist die Einwirkung von Stickstoff auf Zuwachs und Toxinbildung nur in Form verschiedener Zugaben von Nitrat- und Am-

moniumionen anorganischer Nährsalze studiert worden. Als wichtige natürliche Stickstoffquellen dienen für viele Pilze aber auch Aminosäuren. Ihre Bedeutung für verschiedene Pilze variiert stark. STEINBERG (1942) gibt an, daß von 22 untersuchten Aminosäuren nur sieben als Stickstoffquellen für *Aspergillus niger* gut geeignet seien. LEONIAN und LILLY (1940) untersuchten die Wirkung von 24 Aminosäuren auf den Zuwachs von 14 Pilzarten und fanden dabei keine von hervorragender Bedeutung.

Um einige allgemein vorkommende Aminosäuren als Stickstoffquellen für *Polyporus annosus* zu prüfen, wurde ein Versuch mit dem Pilzstamm Nr. 62 angelegt. Zu einer Ausgangslösung nach RAULIN ohne Ammoniumnitrat wurden folgende Substanzen in einer Konzentration von 1,35 g/l gefügt:

Monoamino-Monokarboxyl-Säuren:	$\alpha$ -Alanin, Tryptophan, Tyrosin, Glykokoll, Leucin;
Amid einer Monoamino-Dikarboxylsäure:	Asparagin;
Diamino-Dikarboxylsäure mit Schwefel:	Cystin;
Kontrolle I: Mod. RAULIN-Lösung;	
Kontrolle II: Ausgangslösung.	

Mit der Sporensuspension einer Reiskultur wurden Kolben, mit je 40 ml Lösung versehen, geimpft und dann als Standkultur im Dunkeln bei + 24 ° C eingesetzt. Bei den Ernten nach 5, 10, 15 und 20 Tagen wurden zwei Kolben je Versuchsreihe herausgenommen und der Inhalt unter Berücksichtigung des Myzelgewichtes, pH-Wertes und der toxischen Wirkung im Bakterientest analysiert. Die Werte dieser Analyse sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Wie hieraus zu ersehen ist, scheinen die benutzten Aminosäuren, mit Ausnahme von Tryptophan, gleich gute oder geeignetere Stickstoffspender als Ammoniumnitrat zu sein. Als schnell ausgenutzte, „primäre“ Aminosäuren nach STEINBERG (1942) können für *Polyporus annosus* Alanin, Glykokoll, Asparagin und Cystin bezeichnet werden; denn offenbar können diese unmittelbar in den Stoffwechsel einbezogen und ausgenutzt werden. Als eine „sekundäre“ Aminosäure kann Tyrosin angesehen werden; denn erst nach sehr langer Zeit wird ein maximaler Zuwachs erreicht. Wahrscheinlich wird diese Säure langsam deaminiert. In einem Versuch mit Zugabe von 1 mg Tryptophan je Kolben findet FRIES (1951) eine Zuwachsabnahme von 7,6 mg Myzel in der Kontrolllösung auf 3,4 mg Myzel in der Tryptophan enthaltenden Nährlösung. Daß Tryptophan ein so wenig geeigneter Stickstoffdonator für den Pilz ist, kann auf der komplizierten Molekülstruktur des Benzopyrrolkernes beruhen. Endlich ist bemerkenswert, daß Pepton so relativ geringe Myzelproduktion liefert.

Aus dem Zusammenhang zwischen dem Zuwachs und der Toxizität im Bakterientest geht hervor, daß die antibiotische Aktivität, mit wenigen Ausnahmen, ihr Maximum bei dem Zuwachsmaximum erreicht. Daß eine



Tabelle 13

Einwirkung einiger Aminosäuren auf das Myzel-  
filtraten bis

Komplettierende Aminosäure	Myzelgewicht							
	5 Tage		10 Tage		15 Tage		20 Tage	
	pH	mg	pH	mg	pH	mg	pH	mg
$\alpha$ -Alanin	3,3	119,9	3,4	130,6	3,6	128,1	3,8	112,7
Tryptophan	3,4	36,7	3,4	3,9	3,5	25,4	3,4	5,2
Tyrosin	3,2	79,8	3,2	103,1	3,3	177,0	3,4	141,3
Glykokoll	3,4	120,2	3,6	162,9	4,1	150,7	4,5	142,2
Leucin	3,4	62,9	3,4	85,7	3,5	79,8	3,6	78,8
Asparagin	3,4	109,4	3,5	120,9	3,9	120,0	4,2	107,3
Cystin	3,1	117,1	3,0	122,2	3,0	127,0	2,9	106,0
Pepton	3,3	67,8	3,3	98,8	3,4	96,3	3,4	102,2
Kontr. I	3,1	78,3	2,9	90,3	3,0	86,5	3,0	78,8
Kontr. II	3,3	8,4	3,3	±	3,4	±	3,1	±

antibakterielle Wirkung auch im Kulturfiltrat mit so schwachem Myzelwachstum wie das der Kontrolle II zu beobachten ist, hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß der Ausgangslösung  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  mangelt und demzufolge die Weinsäure als freie Säure auftritt. In der Testkonzentration von 10 : 1 dürfte sie antibakteriell wirken.

#### Versuch Nr. 11 : Quantitativer Aminosäureversuch.

Im Versuch 10 lieferte die Zugabe von Glykokoll die größte Gesamtmenge Myzel. Der folgende Versuch nimmt dies zum Ausgangspunkt, um den quantitativen Effekt einer für den Pilz primären Aminosäure zu verfolgen, die als Ersatz für eine andere Kohlen- und Stickstoffquelle dienen kann. Folgende 20 Versuchsreihen sind repräsentiert:

	Anzahl Kolben			
	A	B	C	D
Glykokoll g/l Lösung	RAULINS Lösung ohne $\text{NH}_4\text{NO}_3$	RAULINS Lösung ohne $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Weinsäure	RAULINS Lösung ohne $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Weinsäure, Saccharose	RICHARDS 5 Lösung ohne $\text{NH}_4\text{NO}_3$
0,01	4	4	4	4
0,10	4	4	4	4
0,50	4	4	4	4
1,00	4	4	4	4
5,00	4	4	4	4

RAULINS und RICHARDS 5-Nährlösungen wurden von Stamm Nr. 62 mit einer 1-ml-Sporensuspension je Kolben aus Reiskultur geimpft. Jeder Kolben enthielt 40 ml Lösung und wurde bei  $+ 24^\circ \text{C}$  im Dunkeln als Standkultur inkubiert. Nach zehn Tagen fand die Ernte statt, wobei pH-Werte, Myzelgewichte und toxische Aktivität analysiert wurden. In Tabelle 14 sind die Analysenresultate angegeben.



Noch einmal zeigt sich Glykokoll als eine ausgezeichnete Stickstoffquelle für den Pilz, wie das aus den Werten der Reihen A und D, d. h. RAULINS und RICHARDS 5-Lösung ohne Ammoniumnitrat hervorgeht. Der Zuwachs in R<sub>1,5</sub> beträgt kaum die Hälfte desjenigen in RAULINS Nährlösung. Mit steigenden Zugaben von Glykokoll nimmt die Myzelproduktion zu. Das Optimum wird in Versuchsreihe A zwischen 1 und 5 g Glykokoll je Liter Lösung erreicht. Auch in D zeigt sich dieselbe Tendenz, obwohl die absoluten Werte geringer sind. Die Gegenwart von Weinsäure in A bestätigt für *Polyporus annosus* die Erfahrungen LEONIANS und LILLYS mit *Phycomyces Blakesleeanus*. Schon kleine Zugaben von Karbonsäuren mit vier Kohlenstoffatomen steigern wesentlich das Myzelwachstum.

Ein Vorversuch mit Oxalsäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Citronensäure in je zwei Konzentrationen, 0,016 Mol und 0,008 Mol bei 26 Tagen Standkultur lieferte, sowohl mit dem Pilzstamm Nr. 62 als auch mit SO, ganz überlegene Zuwachswerte in Lösungen mit Bernsteinsäure, wie Tabelle 15 zeigt.

Die Kontrollen wuchsen in kompletter RAULINS Nährlösung, wo Weinsäure eine Molarität von 0,017 repräsentiert. Die relativ hohe Konzen-

Tabelle 15

Zuwachs und pH-Veränderungen bei Zugabe von Karbonsäuren zu einer Grundlösung

Anfangs-pH	Karbonsäure	Pilzstamm 62				Pilzstamm SO			
		0,016 Mol.		0,008 Mol.		0,016 Mol.		0,008 Mol.	
		End-pH	Myzel mg	End-pH	Myzel mg	End-pH	Myzel mg	End-pH	Myzel mg
4,8	Bernsteinsäure	2,9	155,1	2,9	274,3	2,7	296,3	2,2	313,5
4,8	Äpfelsäure	7,1	26,0	7,0	67,6	8,0	14,3	8,6	41,4
4,8	Citronensäure	7,1	51,0	7,0	50,4	7,6	21,7	7,4	40,2
4,8	Oxalsäure	6,1	68,0	6,4	15,2	4,0	130,5	7,2	15,3
7,8	Kontrolle (Weinsäure)	2,3	285,5	—	—	2,4	315,0	—	—

Tabelle 16

Zuwachs und antibiotische Effekte des Kultur-  
zum Pilz-

Aminosäure	Anfangs-pH	Kulturzeit Tage					
		5		10		15	
		End-pH	Myzel mg	End-pH	Myzel mg	End-pH	Myzel mg
Cystin	2,9	3,1	19,2 ± 0,9	2,9	24,4 ± 0,2	2,9	21,2 ± 2,7
Tryptophan	3,0	3,1	11,0 ± 0,2	3,0	8,1 ± 0,2	3,1	1,4 ± 0,3
Valin	3,0	2,9	38,2 ± 0,9	2,8	49,1 ± 4,2	3,0	47,7 ± 2,0
Asparaginsäure	2,9	3,0	51,3 ± 3,5	2,0	67,4 ± 2,7	3,1	62,1 ± 2,7
Glutaminsäure	2,9	2,9	37,6 ± 1,1	2,8	46,0 ± 1,6	3,0	43,9 ± 2,7
d-Histidin-HCl	2,9	3,0	9,4 ± 0,4	2,9	8,3 ± 0,7	3,1	4,2 ± 0,2
Kontrolle	2,8	2,5	60,3 ± 3,8	2,4	116,7 ± 7,7	2,4	102,6 ± 4,8

tration 0,016 Mol gab niedrigere Myzelgewichte als diejenige von 0,008 Mol, mit Ausnahme der Oxalsäure, bei der die höhere Konzentration die größte Myzelproduktion bewirkte. Die pH-Werte, mit n NaOH auf 4,8 justiert, verschoben sich in den Lösungen mit Bernsteinsäure in saurer Richtung, während die übrigen starke Verschiebungen gegen eine neutrale oder alkalische Reaktion aufweisen. Diese auseinandergehenden pH-Werte lassen vermuten, daß in Gegenwart von Saccharose und Stickstoff die Bernsteinsäure und Weinsäure schnell in KREBS Säurezyklus einbezogen werden, während Citronensäure, Oxalsäure und Äpfelsäure über andere, langsamere Wege in andere Teile des Stoffwechsels und in andere Verbindungen eingehen.

Vergleicht man die totale Myzelproduktion der Reihen A, B und C (Tabelle 14), so findet man, daß Mangel an Ammoniumnitrat, Weinsäure und Saccharose den Wert 44,4 mg gibt. Zugesezte Saccharose steigert das Myzelgewicht auf 62,5 mg. Zugabe von 2,66 g Weinsäure je Liter Lösung gibt einen Ertrag von 359,3 mg Trockengewicht. Die Mittelfehler einiger Analysen sind jedoch zu groß, um die gegenseitigen Verhältnisse exakt festzustellen.

Das Kulturfiltrat wurde auf 4 : 1 konzentriert und dann für den Bakterientest benutzt. Es geht aus der Tabelle 14 hervor, daß die Versuchsreihe A, die den größten Myzelzuwachs zeigte, auch die kräftigste toxische Aktivität besaß. Das Maximum lag bei einer Zugabe von 0,50 bis 1,00 g Glykokoll/l Lösung. Mit 5,00 g/l nahm die Aktivität etwas ab, wahrscheinlich infolge einer schwach puffernden Wirkung der Lösung, wie dies der etwas höhere pH-Wert ausdrückt. Die Toxinbildung in RICHARDS 5-Lösung war ziemlich schwach. Die Bakterienplatten zeigten Verdünnungszonen anstatt Hemmzonen. Die Versuchsreihen B und C gaben äußerst schwach hemmende Aktivität in den Kulturfiltraten.

#### Versuch Nr. 12: Zuwachs und Toxinbildung in Kultur mit Aminosäuren.

Im vorliegenden Versuch wird die Wirkung noch einiger weiterer Aminosäuren auf Zuwachs und Toxinbildung bei *Polyporus annosus* geprüft. Es wurden Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, d-Histidinmonochlorid, Try-

filtrates bei Zugabe von einigen Aminosäuren  
stamm Nr. 62

Tabelle 16

Kulturzeit Tage		Hemmungen in mm Ø Bakterium							
		ETH 2072 Tage				ETH 2018 Tage			
		5	10	15	25	5	10	15	25
End- pH	Myzel mg								
25									
2,9	41,0 ± 2,8	9	10	11	10	11	10	9	9,5
3,0	9,9 ± 0,9	9	8	8	9	9,5	10	11	12
2,9	51,1 ± 2,5	13	9	9,5	11	8	11	10,5	10
3,0	76,3 ± 1,6	10	10,5	10	10	10,5	10,5	10	10,5
2,9	47,8 ± 2,4	9	10	10,5	11,5	12	13	13,5	14
2,9	8,6 ± 0,3	8,5	8	9	8	10,5	10	11,5	10,5
2,2	120,7 ± 3,0	9	9	13	12	7,5	±	9,5	10



ptophan, Cystin und als Kontrolle komplette RAULIN-Lösung gewählt. Dieselbe Ausgangslösung wie im Versuch 10 wurde benutzt und von jeder Aminosäure 1,0 g/l Lösung in den sechs Versuchsreihen zugegeben. Ernten von vier Kolben je Aminosäure fanden nach 5, 10, 15 und 25 Tagen statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengestellt.

Hieraus ist zu ersehen, daß in den Lösungen mit Tryptophan als Stickstoffquelle wiederum der schwache Zuwachs auftritt. Mit Cystin gibt es in diesem Versuch einen erheblich geringeren Zuwachs als im Versuch 10, wahrscheinlich durch die niedrigere Konzentration Cystin in der Ausgangslösung bedingt. Asparaginsäure kann, gerade wie das Amid Asparagin nach der Terminologie STEINBERGS, als eine primäre Aminosäure für *Polyporus annosus* bezeichnet werden. Das Valin, eine Monoamino-Dikarboxylsäure, und die Monoamino-Monokarboxylsäure, Glutaminsäure, leisten trotz der Unterschiede in der Molekülstruktur im wesentlichen denselben Myzelzuwachs. Histidin-HCl stellt eine ausgesprochen ungeeignete Stickstoffquelle für den Pilz dar.

Die pH-Werte zeigen infolge des amphoteren Charakters der Aminosäuren mit ihren puffernden Eigenschaften geringe Veränderungen. In den Kontrollen kann mit steigender Kulturzeit die früher beobachtete Verschiebung in saurer Richtung registriert werden.

Die Toxinbildung zeigt keine enge Korrelation mit dem Zuwachs. Doch ist zu beobachten, daß die geringsten Zuwachswerte den kleinsten Hemmungszonen entsprechen, was besonders in den Lösungen mit Tryptophan und Histidin-HCl hervortritt. Kräftige Hemmung gibt Glutaminsäure im *Escherichia*-Test. In diesem Fall ist zunehmender Zuwachs von steigender antibiotischer Aktivität begleitet, was die anderen Aminosäuren nicht eindeutig hervorrufen.

### Aufarbeitung des Toxines

In der langen Reihe von Pilzen, welche auf antibiotische Aktivität getestet sind, nachdem FLEMING (1929) seine Arbeiten über *Penicillium* und Penicillin veröffentlicht hat, ist die Gattung *Polyporus* von ROBBINS, KAVANAGH und HERVEY (1947), von WILKINS und HARRIS (1944) und von RENNERTFELT und PARIS (1953) untersucht worden. WILKINS und HARRIS fanden keine antibiotische Aktivität von *Fomes annosus* Fr. In einem Versuch machten sie einen Extrakt aus Fruchtkörpern des Pilzes und prüften diesen gegen *Staphylococcus aureus* und *Bacterium coli*. In einem anderen Versuch mit denselben Testbakterien legten sie ausgeschnittene Scheiben des auf Malzagarplatten gewachsenen Pilzes auf die Bakterienplatten. Helle Zonen rings um die Scheiben wurden als Maß der antibiotischen Aktivität genommen. Auch in diesem Versuch waren die Ergebnisse negativ, und nicht nur für *Fomes annosus*, sondern auch für die übrigen Arten der Gattung *Fomes*. ROBBINS et al. züchteten *Polyporus biformis* in Nährlösungen mit u. a. Dextrose, Corn Steep Liquor und Buchenspäne. Isolierung und Extraktion erfolgte nach der Beschreibung im Versuch 7. Nach Kristallisation der Toxine, die man Biformin und Biforminsäure nannte, wurde ein quantitativer Test mit einer

großen Anzahl von Bakterien ausgeführt. Zehn davon zeigten sich empfindlich und wurden von Biformin und Biforminsäure gehemmt. RENNERFELT und PARIS fanden in einem Kulturversuch mit *Polyporus annosus* Substanzen, die den Zuwachs von sowohl Bakterien als auch Pilzen inhibierten. Die größte antibiotische Aktivität erhielten sie, wenn die Grundlösung mit einem Extrakt von Kiefernadeln ergänzt wurde.

Um die antibiotische Aktivität des Toxines von den beiden Versuchen 3 und 7 festzustellen, kam die Agar-Cup-Methode von ERLANSON (1951) zur Anwendung. Das antibiotische Wirtsspektrum des 12,5%igen Rohtoxines ist in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17  
Aktivitätsspektrum des Toxines

Journal-Nr. Lund	Bakterium	Hemmung in mm $\phi$	Anmerkungen
1016	<i>Escherichia coli</i>	(—)	
1024	<i>Staphylococcus aureus</i> K 1	24	
1033	<i>Staphylococcus aureus</i> K +	14	
1038	<i>Staphylococcus aureus</i> K +	18	*
1039	<i>Escherichia coli</i>	11	Penicillin-resistent
1044	Coliformer Stab	14	Totalresistent in den Routinetesten
1045	<i>Enterococcus</i>	15	Penicillin- und sulphathiazol-resistent
1046	<i>Escherichia coli</i>	—	
1047	<i>Escherichia coli</i>	(—)	
1049	<i>B. proteus</i>	11	Empfindlich nur für Chloromycetin
1053	<i>B. proteus</i>	(—)	
1055	Coliformer Stab	12	
1077	<i>Staphylococcus aureus</i>	22	
1084	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	
1081	<i>Staphylococcus aureus</i>	23	
1057	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	
1082	Gram-negative	(—)	
1075	Gram-negative	(—)	
1083	Gram-negative	11	
1088	Gram-negative	(—)	
1065	Gram-negative	17	
1087	<i>B. proteus</i>	10	
237 Kir.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	
1089	<i>Enterococcus</i>	14	
1078	<i>Enterococcus</i>	11	
1076	<i>Enterococcus</i>	12	
1085	<i>Enterococcus</i>	17	
1086	<i>Enterococcus</i>	17	
1066	<i>Enterococcus</i>	13	
1090	<i>Enterococcus</i>	14	
1067	<i>Enterococcus</i>	14	

(—) Hemmung nur innerhalb des Cups.

Wie die Tabelle zeigt, gibt es unter den 31 Arten und Stämmen fünf von *Staphylococcus aureus*, die besonders empfindlich gegen das Toxin sind. Die Hemmungszonen variieren zwischen 22 bis 26 mm Durchmesser. Ein nicht

näher definierter coliformer Stab, der gegen die acht routinemäßig im Bakteriologischen Institut an der Universität zu Lund benutzten Antibiotica total-resistent war, wurde im Test mit dem Rohtoxin von Versuch Nr. 3 vierzehn mm gehemmt. Ein Stamm von *Escherichia coli*, der penicillinresistent war, konnte eine klare Zone von 11 mm Durchmesser nicht überwachsen. Ein penicillin- und sulpharesistenter Stamm von *Enterococcus* gab eine helle Zone von 15 mm Durchmesser. In zwei Fällen wurde beobachtet, daß das Rohtoxin den Zuwachs Gram-negativer Bakterien inhibierte; in drei anderen gab es nur eine Hemmung innerhalb der Cups.

Dieser Roh-test mit verschiedenen Bakterien und Bakterienstämmen bestätigt, daß das Toxin eine antibiotische Wirkung im Sinne WAKSMANS besitzt: „an antibiotic or an antibiotic substance is a substance produced by microorganisms, which has the capacity of inhibiting the growth and even of destroying other microorganisms“ (1947).

Um eine Auffassung von dem Aussehen der Standardkurve des Roh-toxines zu bekommen, wurde eine wäßrige Verdünnungsserie mit den Kon-

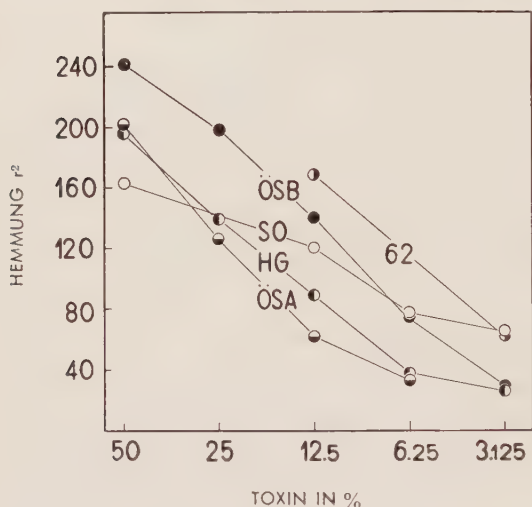


Abb. 13. Standardkurven von Rohtoxinen verschiedener Pilzstämme. Testorganismus *Staph. aureus*

zentrationen längs der Abszisse in logarithmischer Skala eingetragen und längs der Ordinate die Quadratradien.

Unter den Standardkurven der Rohtoxine zeigt ÖS/B eine beinahe gerade Linie im Diagramm, was auf Homogenität der Substanz deutet. Auch die übrigen Toxine geben akzeptable Standardkurven, obwohl die niedrigsten Konzentrationen zu große Hemmungsradien erzeugen, um einer geraden Linie zu folgen. Vergleicht man die schwachen Konzentrationen Penicillin, die als Kontrollen dienten, mit den geprüften Toxinen, entsprechend 50 bis 25 % Toxin einer Konzentration von 4 IU/ml, was auf zweierlei Art erklärt werden kann. Entweder ist das Toxin stark mit Verunreinigungen vermengt,

um eine Auffassung von dem Aussehen der Standardkurve des Roh-toxines zu bekommen, wurde eine wäßrige Verdünnungsserie mit den Konzentrationen 50, 25, 12,5; 6,25 und 3,125 % angelegt. Keine pH-Justierung wurde vorgenommen. Als Testorganismus diente *Staphylococcus aureus* Lund Nr. 1084. Rohtoxin aus den Kulturfiltraten der Pilzstämme Nr. 62, SO, ÖS/A, ÖS/B und HG wurde nach der obengenannten Agar-Cup-Methode auf große Bakterienplatten gebracht, auf denen die Cups nach der Versuchsmethode der römischen Quadrate verteilt waren. Als Kontrollen dienten zwei Konzentrationen von Penicillin; die eine enthielt 4 IU/ml und die andere 0,2 IU/ml. In der Abbildung 13 sind die Toxinkon-

oder/und das antibiotische Prinzip ist wenig wirksam. Keine prinzipiellen Unterschiede liegen zwischen dem Rohtoxin, das vom Kulturfiltrat eines aus der Kiefer isolierten Pilzstammes und dem eines von Fichte isolierten Stammes extrahiert wurde, vor.

Um eine Zusammensetzung des Rohtoxines aus mehreren aktiven Substanzen klarzulegen, wurden papierchromatographische Methoden nach CONSDEN (vgl. CRAMER 1954, LINSKENS 1955) bei der weiteren Arbeit zu Hilfe genommen.

Da nichts Wesentliches über die chemischen Eigenschaften des Rohtoxines bekannt war, wurde eine Anzahl von Lösungs- und Entwicklungssystemen geprüft, die unter „Analyse“ beschrieben sind. Der Hauptteil der Chromatogramme lief aufsteigend bei Zimmertemperatur.

Das ausgesprochen beste Lösungsmittelgemisch für Trennungszwecke war Butanol-Eisessig-Wasser (4-1-5). Wiederholtes Chromatographieren in diesem Lösungsmittelgemisch und kurzes Entwickeln mit Ninhydrin bei 102 ° C ließen vier gut abgegrenzte Flecke erscheinen. Jedenfalls besteht das Rohtoxin aus mindestens vier verschiedenen Substanzen. Sämtliche geprüften Toxine von den mit den Pilzstämmen 62, ÖS, SO und HG fermentierten Filtraten zeigten vier Flecke mit  $R_f$ -Werten, die wenig voneinander abwichen. Als repräsentativ für das Filtrat des Stammes Nr. 62 können die folgenden  $R_f$ -Werte angegeben werden: 0,34, 0,52, 0,64 und 0,91.

Mit einer Ausgangsmenge von 15 l Kulturfiltrat wurde ein weitgehendes Aufarbeiten des Toxines vollzogen. Der Pilzstamm Nr. 62 war in kompletter Nährlösung nach RAULIN zehn Tage in Schüttelkultur gezüchtet. Das Myzel wurde abfiltriert und das Filtrat mit 7,5 l Essigester im großen Scheidetrichter mit Rotor extrahiert. Die organische Phase wurde mit 12 000 U/min zentrifugiert, und die nicht sedimentierte Fraktion blieb über Nacht mit Überschuß von Natriumsulfat stehen. Sie wurde dann auf dem Wasserbad bei 60 ° C im Vakuum eingengt, und als Rückstand blieb eine braune, klebrige Substanz. Die Substanz war in Petroläther löslich, und fettige Nebenprodukte wurden dekantiert. Danach wurde erneut eingengt. Dieser Rückstand war in abs. Alkohol, Aceton, Chloroform und Äther löslich, aber nicht in Wasser. Er wurde in 1 % Alkohol aufgenommen und mit Wasser auf 5-, 3- und 1%ige Lösungen verdünnt. Diese wurden auf folgende Bakterien getestet: ETH 2018, ETH 2072 und Lund 2515. In keinem Fall trat eine Hemmung oder Schwächung des Bakterienwachstums auf.

Die mit Essigester extrahierte Wasserphase des Kulturfiltrates wurde in einer Luwa-Apparatur auf 4 l konzentriert, erneut, diesmal mit Chloroform, extrahiert und auf dem Wasserbad bei 60 ° C im Vakuum zu einer blutroten, klebrigen Substanz eingengt. Diese wurde in Petroläther gelöst und von fettartigen Substanzen gereinigt. Die rote Substanz war in organischen Lösungsmitteln löslich, aber in Wasser unlöslich. Sie wurde wie die erste, braune Fraktion in 1 % Alkohol aufgenommen, dann mit Wasser auf 5, 3 und 1 % verdünnt und auf Bakterienplatten mit Lund 2515 getestet. In diesem Fall gab es eine deutliche Hemmung, die 19, 16 und 14 mm im Durchmesser betrug. Sie gab im quantitativen Tomatentest Welkesymptome. Diese rote



Fraktion besaß offenbar die gesamte meßbare antibiotische Aktivität des Filtrates und wurde daher allein weiterbearbeitet.

Um die Reinheit der antibiotischen Substanz zu kontrollieren, wurde eine papierchromatographische Schnellmethode benutzt, die von ISHIDA et al. angewiesen und von LINSKENS (1955) im Zusammenhang mit den sogenannten „summarized papergrams“ beschrieben ist. 17 cm lange und 1 cm breite

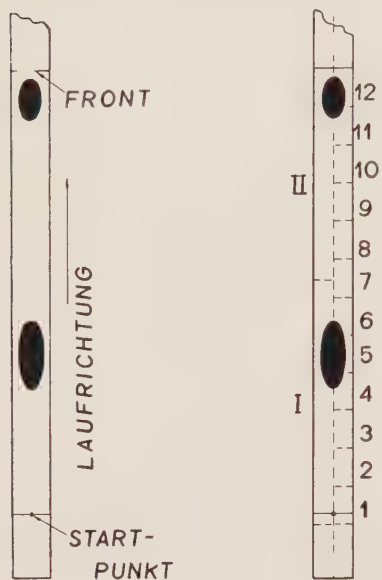


Abb. 14. Schnellmethode für die Trennung der aktiven Substanz. Nach den gestrichelten Linien ist das Papier geschnitten für antibiotischen Plattentest

Streifen von Filterpapier werden mit der Testsubstanz versehen und dann in Reagenzgläschen eingetaucht, welche einige ml Lösungsmittel enthalten. Die Gläschen werden dann zugemacht. Nach 30 bis 120 Minuten ist das Chromatogramm fertig und kann nach dem Trocknen entwickelt werden. Im vorliegenden Falle wurde ein dickes Papier Whatman Nr. 3 MM benutzt, auf welchem beträchtliche Substanzmengen appliziert werden konnten. Beim Entwickeln mit 0,5 % Ninhydrin war das gereinigte Toxin in zwei Komponenten, die deutlich getrennt hervortraten, gespalten. Nicht entwickelte Streifen wurden dann in Stückchen geschnitten, (Abb. 14) und auf Bakterienplatten gelegt, nachdem sie schwach mit sterilem dest. Wasser angefeuchtet worden waren. Bei diesen Tests blieben die Papierstückchen während der Entwicklungszeit der Bakterien liegen. YAMATODANI (vgl. LINSKENS 1955, S. 187) empfiehlt für Antibioticateste, daß die Bakterienplatten mit den Papierstückchen

während drei Stunden im Kühlschrank bleiben sollen. Danach können die Papierstückchen entfernt und die Platten inkubiert werden. Diese Methode zeigte sich im vorliegenden Falle weniger geeignet.

Bei der Ablesung der Platten mit dem Bakterium *Staphylococcus aureus* Lund 2515 wurde festgestellt, daß nur einer von den beiden Flecken, und zwar der mit dem höchsten  $R_F$ -Wert antibiotische Aktivität besaß. In Abbildung 15 ist eine Bakterienplatte mit aufgelegtem, ausgeschnittenem Chromatogramm und Hemmungszonen zu sehen.

Da das Toxin mit Ninhydrin immer Farbreaktionen gegeben hat und Ninhydrin mit Proteinen, Aminen und Peptiden reagiert, aber auch Empfindlichkeit gegen Aminosäuren aufweist (LINSKENS S. 119), wurde ein Eluierversuch aus fünf aktiven Flecken gemacht, welche ausgeschnitten und fein zerkleinert in 80 % Alkohol gebracht wurden. Unter Druck wurde das Eluat ausgepreßt, zum Trocknen eingengt und dann nach der Beschreibung von GORDON und MARTIN (vgl. LINSKENS 1955) in 50  $\mu$ l 6 n HCl aufgenommen. Das gelöste Toxin wurde in eine Kapillare aufgesaugt und diese zugeschmol-

zen 24 Stunden in den Wärmeschrank bei 100 ° C gelegt. Nach dieser Hydrolyse wurde die Kapillare auf ein Stück Polyethen entleert, im Vakuum über Calciumchlorid eingengt und danach in 50  $\mu$ l dest. Wasser aufgenommen. Das hydrolysierte Eluat wurde auf ein Whatman Nr. 1 Filterpapier aufgetragen, nach der aufsteigenden Methode in Butanol-Eisessig-Wasser in der einen Richtung und in wassergesättigtem Phenol in der anderen chromatographiert. Nach dem Trocknen bei Zimmertemperatur wurde mit Ninhydrin besprüht und bei 105 ° C entwickelt. Dabei erschienen vier getrennte Flecke (Abb. 16).

Aus diesen Tatsachen ist man geneigt anzunehmen, daß das antibiotisch wirksame Prinzip des Toxins von Peptidnatur ist, denn die mäßige Hydrolyse eines Peptides spaltet normalerweise die Peptidbindungen und liefert die freien Aminosäuren, wie es bei dieser Hydrolyse geschehen ist und durch das Chromatogramm belegt wurde.

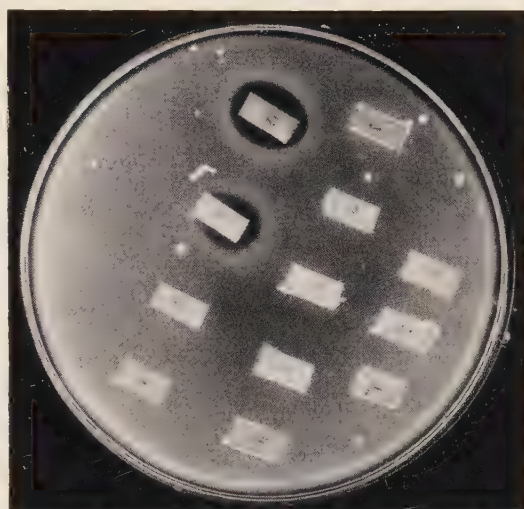


Abb. 15. Hemmungszonen bei *Staph. aureus* mit aufgelegten Papierstückchen nach der Abb. 14 ausgeschnitten

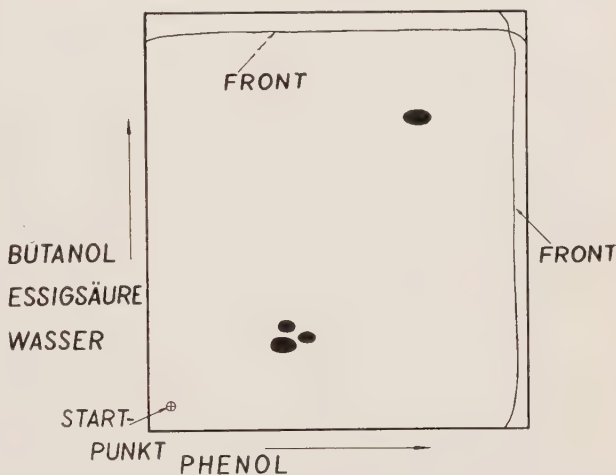


Abb. 16. Die nach der Hydrolyse der aktiven Substanz entwickelten vier Aminosäuren im zweidimensionalen Chromatogramm

### Diskussion

Es war die Absicht des Verfassers, die Zuwachsvariationen verschiedener Stämme von *Polyporus annosus* Fr. unter Berücksichtigung der Wirtspflanze in synthetischen Nährlösungen in vitro zu studieren. Der Hauptteil des benutzten Materials ist von Kiefer und Fichte isoliert. Während des Verlaufes der Untersuchung sind die toxischen Eigenschaften der Stoffwechselprodukte des Pilzes mehr in den Vordergrund getreten. Sowohl Welkeeffekte an Tomatenpflanzen nach Methoden von GÄUMANN et al. (1950 S. 226—256), als

auch Bakterienteste in Übereinstimmung mit der Agar-Cup-Methode nach ERLANSON (1951) und mit der Filterpapiermethode von VINCENT (1944) und LOO (1945) wurden verwendet, um die Art und den Wirkungsgrad der Toxizität zu studieren. Endlich sind papierchromatographische Methoden, wie sie von CONSDEN, MARTIN und SYNGE ausgearbeitet und von CRAMER (1954) und LINSKENS (1955) zusammengefaßt sind, zur Anwendung gekommen. Dadurch konnten die toxischen Substanzen getrennt und die chemische Natur des Toxines untersucht werden.

Schon der Temperaturversuch auf Malzagarplatten gab eine Andeutung, daß meßbare Unterschiede zwischen von Kiefer bzw. Fichte isolierten Stämmen des Pilzes nur mit Schwierigkeit festgestellt werden können. In einem einzigen Versuch, Nr. 9, gab es einen prinzipiellen Unterschied, indem der von Kiefer isolierte Stamm Nr. 62 maximalen Zuwachs im pH-Bereich 4 bis 6 zeigte, aber bei einem pH-Wert von 8 wenig leistete. Der von Fichte isolierte Stamm SO erreichte maximale Myzelproduktion bei pH 8. Nach ROBAK (1933), JÖRGENSEN, LUND und TRESCHOW (1939), RENNERFELT (1952) und TRESCHOW (1938) erzielt man im allgemeinen den größten Zuwachs im pH-Bereich 4 bis 7.

Die Variation innerhalb der Stämme war ausgeprägter als die Variation zwischen den Stämmen. In einem Welkeversuch schien das toxische Welken im Filtrat eines Kiefern-Pilzstammes stärker als im Filtrat, wo der fermentierende Stamm von Fichte rein gezüchtet war. Mit den benutzten Nährmedien und Pilzstämmen können keine einwandfreien Unterschiede zwischen den von Kiefern bzw. Fichten isolierten Pilzen festgelegt werden. Ein Ausgangspunkt für fortgesetzte, erweiterte Studien über die physiologische Natur eventueller Differenzen war damit nicht gegeben. Daher wurde im Verlauf weiterer Untersuchungen dem Studium über die Fähigkeit des Pilzes, verschiedene Formen von Kohlenstoff und Stickstoff auszubeuten, mehr Aufmerksamkeit geschenkt. In diesem Zusammenhang wurde auch der Bedeutung des Kohlen- und Stickstoffes für die Toxinbildung nachgegangen. In einem reinen Zuwachsversuch wurde die überlegene Myzelproduktion in RAULINS Nährlösung mit zwei anderen, der RICHARDSchen und der CZAPEK-DOXSchen, verglichen. Spätere Versuche beachteten einige Faktoren der RAULINS Nährlösung, die in RICHARDS und CZAPEK-DOXS nicht oder andersartig vertreten sind, vor allem Weinsäure und Ammoniumnitrat. So wurde die Bedeutung der Weinsäure und des Ammoniumnitrates in zwei Konzentrationsversuchen demonstriert. Sowohl die Weinsäure als auch das Ammoniumnitrat besitzen entscheidende Bedeutung für den Pilzzuwachs. Schon 0,1 g Weinsäure je Liter Lösung bewirkte eine Zunahme des Myzelgewichtes um 35 %. Zugabe von 0,5 g/l steigerte das Gewicht bis um 115 %, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LEONIAN und LILLY (1940), BURKHOLDER und McVEIGH (1940), BRIAN et al. (1947) und BERNHARD und ALBRECHT (1947) steht, welche über die Wirkung von zweibasischen Karbonsäuren als Kohlenstoffquellen für verschiedene Pilzarten berichten.



Mit Ammoniumnitrat wurde die größte Zuwachssteigerung bei den Konzentrationen 0,5 bis 1,0 g/l Lösung erhalten. Die Toxizität, gemessen mit Bakterientesten, ist hauptsächlich in der Weinsäureserie vorhanden und mit niedrigen pH-Werten verbunden. Wenn die Filtrate alkalisch oder neutral gemacht werden, verschwindet die toxische Aktivität, was auf den Säurecharakter des wirksamen Prinzips deutet. Weitere Versuche mit semisynthetischen Nährlösungen ohne Weinsäure, wie „Corn Steep Liquor“ und „Spänekultur“, gaben beträchtliche Myzelproduktion. In den beiden Lösungen ist Corn Steep enthalten, ein Maisextrakt von verbreiteter Anwendung in der Antibiotica-Produktion.

Mit Aminosäuren als Stickstoffquellen wurde ansehnliches Myzelwachstum bei der Mehrzahl der geprüften Säuren erzielt. Sie stehen in dieser Hinsicht in Parität mit Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle. Nur Tryptophan und Histidin waren von den zwölf benutzten Aminosäuren für das Wachstum von *Polyporus annosus* Fr. ausgesprochen ungeeignet. FRIES (1951) fand bei diesem Pilz besonders niedrige Zuwachswerte, wenn Tryptophan als Stickstoffquelle diente. Nach STEINBERGS (1942) Terminologie sind Alanin, Glykokoll, Asparagin, Cystin und Asparaginsäure „primäre“ Aminosäuren für den Pilz. Sie werden schnell in den Stoffwechsel eingezogen und verwertet. Die Schwierigkeit des Pilzes, Tryptophan und Histidin auszubeuten, kann damit zusammenhängen, daß diese beiden Säuren durch das Vorkommen von Diazol- und Imidiazolringen eine stabilere Molekülstruktur besitzen.

In einem quantitativen Versuch mit der Aminosäure Glykokoll als Stickstoffquelle schien eine maximale Zunahme des Zuwachses zwischen den Konzentrationen 0,5 und 1,0 g/l Lösung zu liegen. Mangel an den drei variierten Faktoren Ammoniumnitrat, Weinsäure und Saccharose gab ein Myzelgewicht von insgesamt 44,4 mg. Mit der Zugabe von Saccharose wurde das Trockengewicht auf 62,5 mg erhöht. Eine Zugabe von 2,66 g Weinsäure je Liter Lösung erhöhte den Myzelertrag beträchtlich auf 359,3 mg, was erneut die Bedeutung der Weinsäure betont.

Schon früh war es klar, daß unter den Stoffwechselprodukten des Pilzes Substanzen gebildet wurden, die Welkeeffekte hervorrufen konnten. In einem Versuch mit Tomatenpflanzen (vgl. GENTILE 1951) wurde ausgeprägteres Welken an den Testpflanzen in Kulturfiltraten beobachtet, die ursprünglich  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  enthielten, als in denen mit  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . In einem späteren Versuch gelang es, das Rohtoxin zu isolieren und mit Chloroform zu extrahieren und die Produktion gewichtsmäßig festzustellen. Der Vergleich zwischen Myzelwachstum und Toxinproduktion legt nahe, daß diese beiden Prozesse im wesentlichen parallel verlaufen. Doch spürt man zuweilen eine Verzögerung der Toxinbildung, wie es z. B. KOBEL (1951) bei *Nectria* gefunden hat.

Im Versuch Nr. 8 zeigten die pH-Werte in den Kulturfiltraten und die antibiotische Aktivität gegenüber *Staph. aureus*, *Bact. coli* und *Pseudomonas aerug.* eine so enge Korrelation, daß die pH-Empfindlichkeit dieser Bakterien zum Gegenstand einer Kontrolle wurde. Jedoch erwiesen sich die pH-Werte



nur zum Teil für die antibiotische Wirkung an Bakterien verantwortlich. Diese Aktivität ging beinahe völlig verloren, wenn das Kulturfiltrat alkalisch gemacht wurde. Dies zeigt, daß die antibiotische Substanz nur im sauren Milieu wirksam ist.

Das Aufarbeiten des isolierten Rohtoxines und die papierchromatographische Trennung zeigte, daß eine einzige von ursprünglich vier nachgewiesenen Komponenten antibiotisch aktiv war. Hydrolyse und wiederholte papierchromatographische Analysen bestätigten, daß das antibiotische Prinzip von Peptidnatur ist; denn durch die Hydrolyse wurde das Toxin gespalten und in vier Aminosäuren zerlegt, die im Chromatogramm nachgewiesen werden konnten und mit Ninhydrin die charakteristische Farbreaktion der Aminosäuren gaben.

### Zusammenfassung

1. Im Temperaturversuch sind größere Variationen innerhalb der von Kiefern und Fichten isolierten Pilzstämme vorhanden als zwischen den Stämmen von verschiedenen Wirtsarten.
2. Qualitative Welkeeffekte lassen sich in von *Polyporus annosus* Fr. fermentierten Kulturfiltraten demonstrieren. Kulturfiltrate mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  zeigten ausgeprägtere Effekte als die mit  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .
3. Die Myzelproduktion war in RAULINS Nährlösung beim Vergleich mit der in RICHARDS und CZAPEK-DOXS Nährlösung am größten. Den schnellsten Zuwachs erwies der Pilzstamm Nr. 62. Keine Korrelation konnte zwischen dem Zuwachs in den Nährlösungen und der Angriffsintensität im Wald nachgewiesen werden.
4. In einem Konzentrationsversuch mit Weinsäure bzw. Ammoniumnitrat wurde die wesentliche Bedeutung von sowohl Ammoniumnitrat als auch Weinsäure für das Pilzwachstum festgestellt. Die Toxinbildung geschah hauptsächlich in Lösungen mit Weinsäure.
5. Beträchtlicher Zuwachs konnte in den Lösungen beobachtet werden, die keine Weinsäure enthielten. Mit der Zugabe von dem Maisextrakt Corn Steep wurde ein maximaler Ertrag erreicht. Die Toxizität des Filtrates war im Tomatentest ziemlich schwach.
6. Der Pilzzuwachs und die Toxinbildung entsprachen einander gut, obwohl die Toxinbildung eine gewisse Verzögerung gegenüber dem Zuwachs aufwies.
7. Der Zucker- und Weinsäureabbau ist mit der großen Zuwachsphase des Pilzes eng verknüpft. Die pH-Werte und die antibiotische Aktivität zeigen analoge Variationskurven.
8. Eine pH-Serie mit einem von Kiefern und einem von Fichten isolierten Pilzstamm zeigte einen prinzipiellen Unterschied. Maximaler Zuwachs

- für den Kiefern-Stamm wird im sauren Bereich, pH 4 bis 6, erreicht, während maximaler Zuwachs des Fichten-Stammes bei pH 8 stattfand.
9. Von zwölf geprüften gewöhnlichen Aminosäuren waren nur Tryptophan und Histidin als Stickstoffquellen für den Pilz ausgesprochen ungeeignet. Alanin, Asparagin, Cystin, Glykokoll und Asparaginsäure müssen für den Pilz als primäre Aminosäuren gelten und werden schnell genutzt.
  10. Ein quantitativer Versuch mit Glykokoll als Stickstoffquelle ergab eine zunehmende Myzelproduktion mit steigenden Mengen von Glykokoll. Auch aus diesem Versuch ging die Bedeutung der Weinsäure für den Zuwachs und die Toxinbildung hervor.
  11. Das Rohtoxin wurde extrahiert und isoliert. Mit Hilfe papierchromatographischer Methoden ist es gelungen, die einzig aktive Substanz des Komplexes im Rohtoxin abzutrennen. Eine Hydrolyse dieser Substanz ergab vier Aminosäuren. Dies legt die Peptidnatur der antibiotisch aktiven Substanz nahe.

### Literaturverzeichnis

- ARVIDSON, B., 1954: En studie av granrotröta. Sv. Skogsvårdsför. Tidskr. 381—412.
- BARON, A. L., 1950: Handbook of Antibiotics. New York.
- BAVENDAMM, W., 1928: Neue Untersuchungen über die Lebensbedingungen holzerstörender Pilze. Cbl. Bakt. 127—228.
- BAZZIGHER, G., 1953: Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And. Mitt. d. Schweiz. Anst. f. d. Forstl. Versuchsw. 105—132.
- BERNHARD, K., und H. ALBRECHT, 1947: Stoffwechselprodukte des Microorganismus *Phycomyces Blakesleeana* in Glucose-haltiger Nährlösung und Untersuchungen über das Wachstum dieses Schimmelpilzes bei verschiedenen Stickstoffquellen. Helv. Acta Chim. 627—632.
- BEHRENS, O. K., 1949: Biosynthesis of penicillins. Chem. of Penicillin, 656—667.
- BJÖRKMAN, E., 1949: Soil antibiotics acting against the root-rot fungus (*Polyporus annosus* Fr.). Phys. Plant, 1—11.
- BRIAN, P. W., P. J. CURTIS, H. G. HEMMING, C. H. UNWIN and J. M. WRIGHT, 1949: Alternaric acid a biologically active metabolic product of the fungus *Alternaria solani*. Nature 534.
- —, and H. G. HEMMING, 1947: Production of antifungal and antibacterial substances. Preliminary examination of 166 strains of Fungi imperfecti. J. Gen. Microbiol. 158—167.
- BURKHOLDER, P. R., and I. VEIGH, 1940: Growth of *Phycomyces Blakesleeana* in relation to varied environmental conditions. Am. J. Bot. 634—640.
- CHARLES, J. H. W., H. RAISTRICK, R. ROBINSON and A. R. TODD, 1933: Studies in the biochemistry of microorganisms XXVIII: Helminthosporin and hydroxyhelminthosporin, metabolic products of the plant pathogen *Helminthosporium gramineum* Rabenh. Bioch. J. 449—511.
- COLLIER, H. O. J., 1948: Antibiotics today. Research I. 501—508.
- CRAMER, F., 1954: Papierchromatographie. 3. Aufl. Weinberg.

- ENEBO, L., 1949: Experiments with Claviformin as an antibiotic against *Polyporus annosus* Fr. Phys. Plant. 56—61.
- ERLANSO, P., 1951: Determination of the sensitivity in vitro of Bacteria to chemotherapeutic agents. Acta Path. et Microb. Scand. Suppl. 1—163.
- FELDMAN, A. W., N. E. CAROSELLI and F. L. HOWARD, 1950: Physiology of toxin production by *Ceratostomella ulmi*. Phytopathology 341—355.
- FLEMING, A., 1929: On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Exp. Path. 226—236.
- FRIES, N., 1951: Effect of certain nucleic acid constituents on the growth of some higher fungi. Nature 1045.
- FÄHRÆUS, G., and G. LINDBERG, 1953: Influence of Tyrosine and some other substances on the laccase formation in *Polyporus* species. Phys. Plant. 150—159.
- GENTILE, A. C., 1951: A study of the toxin produced by an isolate of *Botrytis cinerea* from *Exocorda*. Dep. of Bot. Brown Univ. Providence. Rhode Island. Phys. Plant. 370—387.
- GOTTLIEB, S., W. C. DAY and M. J. PEICZAR, 1950: The biological degradation of Lignin. II. The adaptation of white rot Fungi to growth on Lignin media. Phytopathology 926—936.
- GÄUMANN, E., S. NAEF-ROTH and L. ETTLINGER, 1950: Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. Phytopath. Z. 289—299.
- — — und G. MIESCHER, 1950: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. 257—288.
- — — und O. JAAG, 1950: Über das toxische und das physikalisch induzierte Welken. Phytopath. Z. 226—256.
- — — und — — —, 1947: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I, II und III. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 1—34, 132—148, 227—241.
- HODGSON, R., W. H. PETERSON and A. J. RIKER, 1949: The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings. Phytopathology 47—63.
- HOPFFGARTEN, E. H. v., 1933: Beiträge zur Kenntnis der Stockfäule (*Trametes radiciperda*). Phytopath. Z. 1—48.
- HUSSAIN, M., 1952: *Fomes annosus* (Fr.) CKE., a common root rot. Pakistan J. For. 216—220.
- JARVIS, F. G., and M. J. JOHNSON, 1947: The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. J. Amer. chem. soc. 3010—3018.
- JØRGENSEN, C. A., A. LUND og C. TRESCHOW, 1939: Undersøgelser over rodfordærveren *Fomes annosus* (Fr.) CKE. Den Kgl. Vet. og Landbohøjskole Aarskr. 71—130.
- — —, 1954: Trametesinfektion. Dansk Skovfor. Tidsskr. 11.
- — — and K. VEJLBY, 1953: A new polyphenol oxidase test. Phys. Plant. 533—538.
- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria Cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Z. 157—195.
- LAGERBERG, T., 1923: Rötornas betydelse för granen och dess avkastning. Sv Skogsv. För. Tidsskr. 313—346.
- LAW, K., 1950: Phenol oxidases in some wood-rotting fungi. Ann. Bot. 69—79.
- LEONIAN, L. H. and V. G. LILLY, 1940: Studies on the nutrition of fungi. Factors influencing the growth of some thiamin-requiring fungi. Am. J. Bot. 670—676.
- LINDBERG, G., 1946: On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil-inhabiting Hymenomycetes. Ark. Bot. 1—16.

- LINSKENS, H.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin-Göttingen 1955.
- LOCKWOOD, L. B., G. E. WARD and O. E. MAY, 1936: The physiology of *Rhizopus oryzae*. J. Agr. Res. 847—859.
- LOO, Y. H., P. S. SKELL and H. H. THORNBERRY, 1945: Assay of Streptomycin by the paper-disc plate method. J. Bact. 701—710.
- MELIN, E. and B. NORKRANS, 1948: Aminoacids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) Fr. Phys. Plant. 176—184.
- MORTON, H. E., W. KOCHOLATY, R. JUNOWICZ-KOCHOLATY and A. KELLNER, 1945: Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. J. Bact. 579—584.
- OXFORD, A. E., H. RAISTRICK and G. SMITH, 1942: Antibacterial substances from moulds. II. Penicillic acid, a metabolic product of *Penicillium puberulum*. Chem. and Ind. 22—24.
- PARTRIDGE, S. M., 1949: Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature 443.
- RENNERFELT, E. and S. K. PARIS, 1952/1953: Some physiological and ecological experiments with *Polyporus annosus* Fr. Oikos 58—77.
- —, 1952: Om angrepp av rottröta på tall. Medd. Stat. Skogsf. Inst. 1—40.
- RISHBETH, J., 1951: Observations on the biology of *Fomes annosus*, with particular references to East Anglian pine plantations. III. Natural and experimental infection of pines, and some factors affecting severity of the disease. Ann. Bot. 221—246.
- ROBAK, H., 1933: On the growth of three wood-destroying Polyporae in relation to the hydrogen ion concentration of the substratum. Sv. Bot. Tidskr. 56—76.
- —, 1942: Cultural studies in some Norwegian wood-destroying fungi. Medd. 25 Vestl. Forstl. Forsöksstn. 1—248.
- ROBBINS, W. J., F. KAVANAGH and A. HERVEY, 1947: Antibiotic substances from basidiomycetes. II. *Polyporus biformis*. Proc. Nat. Acad. Sci. 176—182.
- SAUTHOFF, W., 1955: Über toxische Stoffwechselprodukte in Kulturfiltraten von *Botrytis cinerea* Pers. Phytopath. Z. 1—37.
- SCHULTZ, G., 1938: Der Einfluß einiger Schwermetallsalze auf die chemische Zusammensetzung von *Aspergillus niger*. Planta 198—219.
- STALDER, L., 1954: Untersuchungen über die Graufäule (*Botrytis cinerea* Pers.) an Trauben. Phytopath. Z. 345—381.
- STEINBERG, R. A., 1942: The process of aminoacid formation from sugars by *Aspergillus niger*. J. Agr. Res. 615—678.
- STOLL, C., 1954: Über Stoffwechsel und biologisch wirksame Stoffe von *Gibberella fujikuroi* Woll. dem Erreger der Bakanaekrankheit. Phytopath. Z. 233—275.
- THOMAS, C. A., 1949: A wilt-inducing polysaccharide from *Fusarium solani* f. Eumarti. Phytopathology 572—580.
- TRESCHOW, C., 1938: Undersøgelser over Brintjonkoncentrationens Indflytelse paa Væksten af Svampen *Polyporus annosus*. Det. Forstl. Forsøgsv. i Danm. 17—32.
- TUREL, F., 1952: Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (MART.) App. et Wr. Phytopath. Z. 318—342.
- VINCENT, J. G. and H. W. VINCENT, 1944: Filter paper disc modification of the Oxford cup Penicillindetermination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 162—165.



- WAKSMAN, S. A.: Microbial antagonisms and antibiotic substances. N. Y. 1947.
- —, 1950: Antibiotics and their significance in the physiology of Microorganisms. Proc. Seventh Int. Bot. Congr. Sthlm. 440—447.
- WEIS, F. og N. NIELSEN, 1927: Nogle Undersøgelser over Rodfordaerversvampen (*Polyporus radiciperda*). Dansk Skovforen. Tidskr. 233—246.
- WIELAND, H. und B. WITKOP, 1940: Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. V. Zur Konstitution des Phalloidins. J. Lieb. Ann. d. Chem. 171—183.
- WILKINS, W. H. and G. C. M. HARRIS, 1944: Investigations into the production of bacteriostatic substances by fungi. VI. Examination of larger Basidiomycetes. Ann. Appl. Biol. 2611—2670.
- ÖBLOM, K., 1951: Nutritional effects upon the antibiotic production of *Marasmius ureus* (Bull.) Fr. I. The influence of organic acids. Phys. Plant. 563—573.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule  
in Zürich*

## Über den Einfluß der Eisenernährung auf die Lycomarasmin-Empfindlichkeit der Tomatenpflanzen<sup>1)</sup>

Von

E. GÄUMANN, E. BACHMANN und R. HÜTTER

*Mit 2 Abbildungen*

### Einleitung

Ein Teil der pathogenen Wirkung des Lycomarasmins auf die Blattgewebe der Tomatenpflanzen beruht nach DEUEL (1954), GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN (1955) und GÄUMANN und BACHMANN (1957) auf seiner Fähigkeit, in den Wirtszellen Schwermetallionen zu chelieren, wobei sich in den Grundgeweben der Tomatenblätter zwei gegenläufige Effekte überlagern, nämlich

1. der örtliche Chelierungseffekt: Die überwiegende Zahl der Lycomarasminmolekeln kommt in noch nicht abgesättigtem, also in noch reaktionsfähigem Zustande in den Grundgeweben der Blätter an, entzieht dort bestimmten Organellen und Wirkungssystemen ihre Schwermetallionen, legt dadurch bestimmte enzymatische Vorgänge lahm und verursacht dementsprechend im Zellinnern örtliche Mangelschäden; und

2. der Vehikeleffekt: Gewisse Lycomarasminmolekeln chelieren auf ihrem Wanderungswege durch die Stengel usw. jene Schwermetallionen, die dort an schwächere Chelatbildner gebunden oder direkt als Ionen vorhanden sind und bilden mit ihnen Lycomarasmin-Schwermetallkomplexe. Soweit diese Komplexe wasserlöslich sind (wie dies z. B. bei den Lycomarasmin-Eisen-Komplexen der Fall ist), werden sie vom Transpirationsstrom gleich den nicht abgesättigten Lycomarasminmolekeln in die Grundgewebe der Blätter verfrachtet; hier zerfällt ein Teil von ihnen z. B.

<sup>1)</sup> Die vorliegende Arbeit wurde durch die Eidg. Volkswirtschaftsstiftung unterstützt; wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank wiederholen.

wegen photochemischer Effekte oder wegen eines Abtausches des Schwermetallions durch kräftigere zelleigene Chelatbildner; dadurch werden einerseits die betreffenden Schwermetallionen am „unrichtigen“ Orte in Freiheit gesetzt und führen in den hierfür sensibeln Organellen und Wirkungssystemen der Wirtszellen zu örtlichen Überschwemmungsschäden; und anderseits werden die entsprechenden Lycomarasminmolekeln durch den Verlust ihres Schwermetallions wieder als Chelatbildner regeneriert und verstärken an anderer Stelle derselben Zellen die unter 1. genannten Mangelschäden.

Wenn diese Auffassung richtig ist, so muß die pathogene Wirkung ein und derselben Lycomarasmin-dosis verschieden sein, wenn die Tomatenpflanzen mit einem dieser Schwermetalle, z. B. mit Eisen, verschieden ernährt werden. Nach den Erfahrungen von SCHEFFER und WALKER (1953) wird jedoch die Anfälligkeit der Tomatenpflanzen für die *Fusarium*-Welke innerhalb physiologisch vernünftiger Grenzen durch das Ausmaß ihrer Eisenversorgung nicht beeinflußt, und sie schließen daraus, daß unsere soeben besprochene Arbeitshypothese unrichtig sei. Doch untersuchten sie bei ihrer Versuchsanordnung nicht den Einfluß der unterschiedlichen Eisenversorgung auf die Lycomarasminempfindlichkeit der Tomatenpflanzen, sondern ihren Einfluß auf den Verlauf der Welkekrankheit, verursacht durch das *Fusarium lycopersici*; dieser stellt aber die Resultante aus einer Reihe von heterogenen Komponenten dar; so verschiebt die unterschiedliche Eisenversorgung überdies auch die Widerstandsfähigkeit der Wirtspflanzen gegen die Generalisation des Erregers, ferner das Ausmaß der Toxinproduktion des Erregers im Innern des Wirtes, wobei ja das *Fusarium lycopersici* nicht nur Lycomarasmin produziert, sondern auch Fusarinsäure, Äthylen, Vasin-fuscarin usw.

Um unsere Lycomarasmin-Eisen-Theorie zu bestätigen oder zu widerlegen, muß somit nur ein kleiner Ausschnitt aus dem komplexen, von SCHEFFER und WALKER angeschnittenen Problemfeld geklärt werden, nämlich die Frage, in welcher Weise durch die unterschiedliche Eisenernährung der Tomatenpflanzen ihre Empfindlichkeit für eines dieser Toxine, nämlich für das Lycomarasmin und nur für dieses, ceteris paribus verschoben wird. In welcher Weise sich sämtliche übrigen Aspekte des Krankheitsproblems bei unterschiedlicher Eisenversorgung gestalten, wird erst noch zu prüfen sein.

## 1. KAPITEL

### Die Anzuchtmethode

#### a) Die Gefäße

Die Versuchspflanzen wurden in einer Troganlage in Mitscherlich-töpfen bei einer konstanten Trogtemperatur von 27° und einer Lufttemperatur von meist 22—24° C herangezogen. Die Töpfe waren mit Plastik-

säcken ausgekleidet, die vor ihrer Verwendung sorgfältig mit verdünnter Salzsäure gewaschen und mit dest. Wasser nachgespült wurden. Die Töpfe waren mit Deckeln aus Antikorrodal zugedeckt; sie enthielten je vier kleine Öffnungen, in welchen die Versuchspflanzen mittelst Glaswolle befestigt waren. Die Antikorrodalbleche wurden mit 30 % Alkohol, verdünnter Salzsäure und dest. Wasser gereinigt. Die Glaswolle wurde 24 Stunden in konz. Salzsäure gelegt und hernach während zwei Tagen mit dest. Wasser behandelt.

### b) Die Nährlösung

Ionenaustauschwasser wird nach der Methode von STOUT und ARNON (1939) mit 2 g  $\text{CaCO}_3$  je l versetzt, in Pyrexflaschen während zwei Stunden autoklaviert, nach dem Erkalten mit der Dithizonprobe (SNELL und SNELL, 1936) auf Schwermetallreinheit geprüft und hernach in Plastiktanks dekantiert.

Sämtliche Chemikalien sind analysenrein. Zusammensetzung der Nährlösung und der Spurenelemente (jedoch ohne Eisen) bei ZÄHNER (1955). Das Eisen wird der Nährlösung als Ferrisulfat  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  beigegeben; seine normale Konzentration in der Nährlösung beträgt  $5,0 \cdot 10^{-5}$  molar. Es wurden acht Eisen-Ernährungsstufen hergestellt, in welcher die Konzentration des Ferrisulfates zwischen  $1/16$  und  $8 \times$  variierte (z. B. Tabelle 1). Die Nährlösungen wurden mit Plastikmeßbechern auf die Töpfe verteilt.

### c) Die Anzucht der Versuchspflanzen

Tomatenkeimlinge der für das *Fusarium lycopersici* mittelanfälligen Sorte Tuckerswood wurden in Plastikschaalen auf Quarzsand, der mit Salzsäure gereinigt, mit dest. Wasser gespült und hernach autoklaviert worden war, im Gewächshaus bei 22—24 ° C herangezogen. Die Schalen blieben zugedeckt, bis die Keimpflanzen etwa 4 cm hoch waren; dann ließ man sie einen Tag unbedeckt und stellte sie zuletzt zwei Tage in 10—15 °, um die Stengel zu kräftigen.

Im Alter von etwa acht Tagen, wenn die Pflänzchen etwa 5 cm hoch und die Kotyledonen gut ausgebildet waren, wurden sie mit einer Rasierklinge 1—2 mm über den Wurzeln abgeschnitten und in die Nährlösung gebracht, wo sie sich im Laufe einer Woche erneut bewurzelten.

Nach etwa vier Wochen besaßen selbst die gehemmten Pflanzen der Stufen  $1/16$  und  $8 \times$  5—6 Blätter und konnten für den Welketest verwendet werden. Die extremen Eisenmangelpflanzen waren immerhin nur etwa 10 cm hoch, gelblich und stark nekrotisch. Mit zunehmender Eisernährung verschwanden die Nekrosen und die Pflanzen wurden grüner. Sämtliche nekrotischen Flecke wurden bei jedem Blatt genau im Versuchsprotokoll aufgezeichnet, damit keine Verwechslungen mit Lycomarasminschädigungen vorkommen konnten.

Die Pflanzen der Eisenstufe  $1/2 \times$  besaßen beinahe die Größe normal ernährter Individuen, waren aber etwas heller grün und von zarterem



Wuchs. Die normal eisernährten Pflanzen waren 30—40 cm hoch und die untersten Blätter hatten eine Länge bis 10 cm. Die Pflanzen der Stufe 2 waren üppiger gewachsen und von dunklerer Farbe. Bei der Stufe 4 machte sich bereits der schädigende Einfluß der Eisen-Überernährung geltend; die Pflanzen waren nur etwa 20 cm groß und hatten leicht nach unten gerollte Blattränder. Diese Symptome verstärkten sich bei der Stufe 8; hier waren die Pflanzen noch kleiner und zeigten einen eigentümlichen, leicht bräunlichen Farbton.

## 2. KAPITEL

### Die Welkeintensität verschieden mit Eisen ernährter Tomatensprosse

Die beiden hier zu besprechenden Hauptversuche wurden im Frühjahr 1955 und im Herbst 1956 durchgeführt. Sie umfaßten in jeder der acht Eisernährungsstufen 20 möglichst gleichartige Tomatensprosse, also insgesamt je 160 Sprosse. Jeder Sproß erhielt je kg Lebendgewicht 300 mg Lycomarasmin in der Konzentration von  $2,5 \cdot 10^{-3}$  molar zugeführt. Die Test- und Bonitiermethode ist bei ZÄHNER (1955) beschrieben. Die durchschnittlichen Welke-Indices der Blätter der jeweiligen 20 Versuchssprosse finden sich mit ihren Streuungen in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Welkewirkung einer bestimmten Lycomarasmindosis  
(300 mg je kg Lebendgewicht)

bei den Blättern von Tomatensprossen, die bei unterschiedlicher  
Eisernährung gezogen wurden

1 = normale Eisernährung

Eisen-Ernährungsstufe	Welke — Indices	
	1. Versuchsreihe	2. Versuchsreihe
1/16	1,35 $\pm$ 0,38	1,10 $\pm$ 0,49
1/8	1,28 $\pm$ 0,28	0,76 $\pm$ 0,39
1/4	0,77 $\pm$ 0,33	0,66 $\pm$ 0,39
1/2	1,06 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,27
1	1,47* $\pm$ 0,54	0,52 $\pm$ 0,32
2	1,60* $\pm$ 0,52	0,54* $\pm$ 0,22
4	1,63* $\pm$ 0,20	1,05* $\pm$ 0,36
8	2,16* $\pm$ 0,28	1,23* $\pm$ 0,48

\* Deutliche Symptome der Eisenschädigung.

### § 1. Quantitative Verschiebungen in der Symptomausprägung

Die Intensität der durch die Lycomarasmindosis von 300 mg je kg Lebendgewicht ausgelösten Schädigungen ist in den zwei Versuchsreihen, da sie in verschiedenen Jahren und zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt wurden, etwas verschieden. Der grundsätzliche Verlauf der Schädigungskurve gestaltet sich jedoch in beiden Fällen gleich. Im Bereich der Eisen-

Unterernährung nimmt nämlich in beiden Versuchsreihen die Schädigungsintensität der Tomatensprosse bei steigender Eisenversorgung zunächst ab (linker Schenkel der Schädigungskurven in Abb. 1). Bei der Ernährungsstufe  $\frac{1}{4} \times$  (in der ersten Versuchsreihe) bzw.  $\frac{1}{2} \times$  (in der zweiten Versuchsreihe) durchläuft die Schädigungskurve ein Minimum, das in der ersten Versuchsreihe rund  $\frac{3}{5}$ , in der zweiten Versuchsreihe rund  $\frac{2}{5}$  des Ausgangswertes beträgt. Hernach steigt sie mit wachsender Eisenversorgung wieder an und erreicht bei der Eisernährungsstufe  $8 \times$  in beiden Versuchsreihen den nahezu dreifachen Betrag des Schädigungsminimums.

Die Differenzen zwischen den mittleren Schädigungen in den verschiedenen Eisernährungsstufen und dem Tiefpunkte der Schädigungskurve sind auch in der zweiten Versuchsreihe, obschon sie etwas weniger prägnant verläuft als die erste, statistisch gut bis sehr gut gesichert.

Ein und dieselbe Lycomarasminmenge löst somit in den Tomatensprossen bei steigender Eisernährung unterschiedliche Schadwirkungen aus, und zwar Schadwirkungen, die quantitativ im Sinne einer Minimumkurve verlaufen.

## § 2. Qualitative Verschiebungen in der Symptomausprägung

Die Schädigungen, welche die in Frage stehende Lycomarasminindosis bei den Tomatenpflanzen bei steigender Eisernährung auslöst, verschieben sich jedoch nicht nur, wie in Abb. 1 dargestellt, in quantitativer, sondern überdies auch in qualitativer Hinsicht, wobei der Umschlag im Bereich der Eisernährungsstufen  $1 \times$  und  $2 \times$  erfolgt.

Bei den Eisenmangelpflanzen der Stufe  $\frac{1}{16}$  treten als Folge der Lycomarasminschädigung in den Interkostalfeldern

zahlreiche runde, bis 4 mm große, graue oder braune Nekrosen auf, die ähnlich aussehen wie Eisenmangelnekrosen.

Spitzenschädigungen sind nur sehr schwach vorhanden und Rand-schädigungen fehlen gänzlich. Mit zunehmender Eisenversorgung nimmt die Zahl der durch das Lyco-

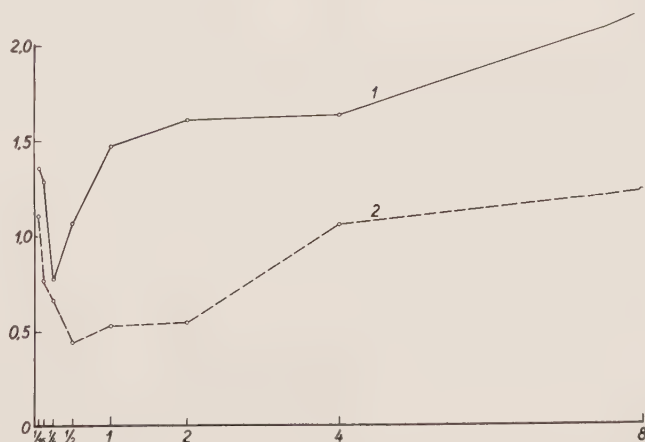


Abb. 1. Der Einfluß steigender Eisernährung auf die Intensität der Schädigungen, die eine bestimmte Lycomarasminmenge bei jungen Tomatensprossen auslöst. Abszisse: Relativer Eisengehalt der Nährlösung, wobei der Wert 1 einer Normalernährung entspricht. Ordinate: Durchschnittliche Schädigung der Blätter der Tomatensprosse in der ersten (Kurve 1) und in der zweiten Versuchsreihe (Kurve 2)

marasmin bedingten Eisenmangelnekrosen ab; die Spitzenschädigungen werden dagegen kräftiger, und es treten Randschädigungen auf.

Bei der Eisenernährungsstufe  $1\times$  beginnen als Folge der Lycomarasminwirkung leichte Eisenüberschwemmungsschäden, z. B. dunkle Nekrosen der Blattspitzen, sichtbar zu werden. Die Symptome der Eisenvergiftung nehmen mit steigender Eisenüberernährung zu; sie bestehen zur Hauptsache in starken Spitzen- und Randnekrosen und leichtem Einrollen der Blattspreiten nach unten.

In qualitativer Hinsicht verstärkt somit das Lycomarasmin bei den Eisen-Mangelpflanzen die Symptome des Eisenmangels, bei den Eisen-Überschußpflanzen die Symptome des Eisenüberschusses.

### 3. KAPITEL

#### Der Eisengehalt der Versuchspflanzen

Der Einfluß der unterschiedlichen Eisenernährung auf den gesamten Eisengehalt der Stengel und der Blätter und auf das an ihrem Preßsaft gelöste Eisen wurde an Hand der Pflanzen der zweiten Versuchsreihe der Tabelle 1 verfolgt; und zwar wurden ähnliche Pflanzen und die gleichen Sproßpartien analysiert, wie sie auch in den Welkeversuchen Verwendung fanden, nämlich junge Tomatensprosse mit 4—5 Blättern und den entsprechenden Stengelabschnitten.

#### § 1. Die Methode der Eisenbestimmung

Das Eisen wurde nach der Methode von WONG (1922) und von INGALLS und SHIVE (1931) aufgeschlossen und hierauf nach der Methode von SZALKOWSKI und FREDIANI (1950) bestimmt.

Für die Bestimmung des gesamten Eisengehaltes werden die Stengel bzw. Blätter drei Tage bei  $116^{\circ}\text{C}$  getrocknet. 0,2 g getrocknete Substanz werden in einem Mikrokjeldahlkölbchen aus Pyrexglas genau abgewogen, mit 2 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pro analysi versetzt und über einer kleinen Flamme aufgeköcht, bis weißer Rauch entsteht. Nach kurzem Abkühlen gibt man vorsichtig und langsam 1 ml einer 10%igen Kaliumchloratlösung p.a. zu. Nach kräftigem Schütteln läßt sich die Lösung ohne allzustarke Schaumbildung aufkochen. Der Lösung wird so oft Kaliumchlorat beigegeben, bis sie klar und farblos bleibt. Nach dem Abkühlen spült man sie mit bidest. Wasser in ein 100 ml Meßkölbchen über, gibt 0,5 ml 30%  $\text{HNO}_3$  p.a. zu und füllt bis zur Marke auf; damit ist das Eisen aufgeschlossen und kann bestimmt werden.

Für die Bestimmung des im Preßsaft gelösten Eisens werden genau abgewogene Mengen frischen Materials in Potterkolben (bei den Eisenmangelstufen  $1/16$  —  $1/2$ ) bzw. in einer Turmix-Saftzentrifuge

(bei den Eisernährungsstufen 1—8×) zerquetscht und 15' bei 10 000 Touren zentrifugiert. Dabei bildet sich ein kompakter Bodensatz von Chloroplasten, Fasern und anderem Material; die überstehende, leicht bräunliche Lösung läßt sich gut dekantieren. Die Lösung wird über einer kleinen Flamme sorgfältig eingedickt, bis 1 ml ungefähr dem Saft aus 10 g frischen Pflanzenmaterialies entspricht. Dann wird 1 ml dieses eingedickten Saftes in ein Mikrokjeldahlkölbchen aus Pyrexglas übergeführt und wie oben mit 2 ml konz. Schwefelsäure usw. aufgeschossen.

Für die Bestimmung des Eisens werden 10 ml der vorbehandelten Lösung mit einigen Kristallen Natriumpersulfat aufgekocht, um alles Eisen in die Ferriform überzuführen; dann gibt man sie in einen Scheidetrichter und schüttelt sie mit 10 ml Rhodanidreagens 30 Sek. lang gut auf. Der rote Eisenrhodanidkomplex löst sich vollkommen im Butanol; nach 5' kann die wässerige Phase abgetrennt werden; der Scheidetrichter wird sorgfältig gekippt und langsam gedreht, damit alles an den Wänden haftende Wasser mit dem Reagens in Berührung kommt. Nach weiteren 5' kann die wässerige Phase abermals abgetrennt und das Butanol in Zentrifugengläschen dekantiert werden. Man reinigt die Lösung in der Zentrifuge (5' bei 3500 Touren) und pipettiert 4 ml in Meßcuvetten. Die Extinktion wird in einem Zeiß-Spektralphotometer PMQ II bei der Wellenlänge von 490 m $\mu$  bestimmt. An Hand einer vorher aufgenommenen Eichkurve können die Eisengehalte der Testlösungen abgelesen werden. Sämtliche Bestimmungen wurden in drei Parallelen ausgeführt.

## § 2. Die Eisengehalte der Tomatensprosse

Die Eisen-unterernährten Pflanzen bilden an Frischgewicht verhältnismäßig mehr Blatt- als Stengelsubstanz aus, nämlich im Verhältnis 63 : 37 gegenüber 55 : 45 bei den normal ernährten oder mit Eisen überernährten Parallelen (Tabelle 3). Auch die Trockensubstanzgehalte sind bei den verschiedenen Eisernährungsstufen leicht verschieden; so beträgt der Trockensubstanzgehalt der Blätter in den Eisen-unterernährten Serien 11,5 bis 11,8 % und steigt dann bei den achtfach Eisen-überernährten Parallelen bis auf 13,1 %.

Tabelle 2

Die Eisengehalte der Versuchspflanzen  
in mg je kg Frischgewicht

Eisen- Ernährungsstufe	Gesamteisen in mg je kg in den		Eisen in mg je kg im Preßsaft der	
	Stengeln	Blättern	Stengel	Blätter
1/16	3,09	12,71	1,99	2,08
1/8	4,03	12,62	2,19	2,24
1/4	5,34	16,09	2,22	2,60
1/2	6,56	18,99	3,02	3,23
1	7,10	21,78	3,64	3,51
2	7,44	22,77	4,62	3,79
4	7,81	27,87	4,74	4,21
8	9,65	33,81	4,71	5,67



Tabelle 3

Die Verteilung des Eisens im Innern der Tomatenpflanzen

Eisen- Ernährungs- stufe	Von 1 kg frischen Pflanzenmaterials entfallen auf die		Gesamteisen			Eisen im Preßsaft		
	Stengel	Blätter	In d. gesamen- ten Pflanze sind in mg je kg Frischge- wicht vor- handen	Davon entfallen auf die		In d. gesamen- ten Pflanze sind in mg je kg Frischge- wicht vor- handen	Davon entfallen auf die	
				Stengel	Blätter		Stengel	Blätter
	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg
1/16	379	621	9,08	1,17	7,91	2,05	0,76	1,29
1/8	355	645	9,57	1,43	8,14	2,22	0,78	1,44
1/4	359	641	12,22	1,91	10,31	2,46	0,80	1,66
1/2	387	613	14,17	2,54	11,63	3,15	1,17	1,98
1	485	515	14,65	3,44	11,21	3,58	1,77	1,81
2	474	526	15,49	3,51	11,98	4,19	2,19	2,00
4	462	538	18,61	3,61	15,00	4,45	2,18	2,27
8	422	578	23,62	4,07	19,55	5,27	1,99	3,28



Abb. 2. Die Verteilung des Eisens im Innern der Tomaten-  
sprosse. Abszisse: Eisen-Ernährungsstufen. Ordinate:  
Anzahl mg Eisen, welche die Tomatensprosse in 1 kg Frisch-  
gewicht als Gesamteisen in den Stengeln (Kurve 1) und in den  
Blättern (Kurve 2) oder im Preßsaft der Stengel (Kurve 3)  
bzw. der Blätter (Kurve 4) enthalten

Der Eisengehalt der gesamten Tomatensprosse steigt mit zunehmender Eisenversorgung von 9,1 mg je kg Frischgewicht auf 23,6 mg (Tabelle 3); davon lassen sich in sämtlichen Eisen-Ernährungsstufen rund 20—25 % im Preßsaft nachweisen. Die Verteilung dieser beiden Eisenfraktionen im Innern der Tomatensprosse wird höchstens bei den Preßsäften durch die unterschiedliche Eisenernährung in einem geringen Ausmaße verschoben.

Im Preßsaft der Stengel der drei Eisenmangelstufen (1/16 bis 1/4) ist nämlich, bezogen auf den gesamten Eisengehalt des Sprosses, nur rund

halb so viel Eisen vorhanden wie im Preßsaft der entsprechenden Blätter, im Preßsaft der Stengel der mit Eisen normal oder überernährten Parallelen (Stufen 1—4×) dagegen ungefähr gleich viel wie im Preßsaft der entsprechenden Blätter. Es ist deshalb nicht ausgeschlossen, daß bei den Eisenunterernährten Pflanzen der Stengel zugunsten der Blätter etwas Eisenentleert wird.

Welcher Anteil des in Tabelle 3 nachgewiesenen Eisens ist in den Tomatensprossen in einer reagierfähigen Form, also mutmaßlicherweise einem schwachen Komplexbildner wie dem Lycomarasmin zugänglich, vorhanden? Als Anhaltspunkt verwenden wir die Werte, die LIEBICH (1941) bei jungen Blättern normal ernährter Spinatpflanzen (*Spinacia oleracea*) gewonnen hat.

Von je 100 mg Gesamteisen befinden sich im Falle der Spinatblätter 82 mg in den Chloroplasten und 5 mg im Cytoplasma; 13 mg sind im Zellsafte gelöst.

Von den 82 mg Chloroplasteneisen sind 48 mg, also rund  $\frac{3}{5}$ , konstitutionell gebunden und den Chloroplasten stabil eingefügt; davon entfallen rund 10 mg auf Fermenteisen (Cytochrome usw.). Von den restlichen 32 mg sind etwa 6 mg mit Wasser eluierbar, wahrscheinlich zweiwertig und den Komplexbildnern mehr oder weniger (vielleicht zur Hälfte) zugänglich. Die übrigen rund 25 mg sind wahrscheinlich locker an phosphorfreie Eiweißkörper gebunden und dreiwertig. Da die Assimilationsgifte das an Eiweiß adsorbierte Chloroplasteneisen freilegen und in die ionisierte Form übergehen lassen, so dürfen wir vermuten, daß dieses Eisen auch dem Lycomarasmin mehr oder weniger zugänglich ist.

Beim cytoplasmatisch gebundenen Eisen (5 mg) und beim wasserlöslichen Eisen (13 mg) dürfen wir wiederum als Arbeitshypothese annehmen, daß rund die Hälfte für eine Umlagerung mit dem eindringenden Komplexbildner zur Verfügung steht oder innerhalb nützlicher Frist freigemacht werden kann.

Somit würden im Falle der Spinatblätter von je 100 mg Gesamteisen rund 16 mg Chloroplasteneisen, 2 mg cytoplasmatisch gebundenes Eisen und 6 mg wasserlösliches Eisen, also rund 25 mg reagierfähiges Eisen zur Verfügung stehen, d. s. 25 % der gesamten Eisenmenge. Selbstverständlich ist diese Schätzung vollkommen roh, und wir wissen auch nicht, wie weit sich die an jungen Spinatblättern gewonnenen Zahlen auf die Blätter und insbesondere auf die Stengel junger Tomatensprosse übertragen lassen.

#### 4. KAPITEL

##### Das Zusammenwirken des Lycomarasmins mit dem wirtseigenen Eisen

Nach der eingangs geschilderten Arbeitshypothese setzt sich die pathogene Wirkung des Lycomarasmins im Schwermetallsektor aus zwei gegenläufigen Komponenten zusammen, die in ein und derselben Wirtszelle zu

örtlichen Mangelschäden und zu örtlichen Überschwemmungsschäden führen. Wenn sich die vorliegende Arbeit auf ein einziges dieser Schwermetalle, nämlich auf das Eisen, beschränkt und den Sachverhalt so darstellt, als ob sich nur Eisenmangel und Eisenüberschuß gegenüberständen, so werden dadurch die Dinge drastisch vereinfacht; denn einerseits treten sämtliche zell-eigenen („autochthonen“) Chelatbildner je nach ihrem Chelierungsvermögen in Wettstreit mit dem Lycomarasmin als Chelatbildner, und andererseits stehen im Zellinnern sämtliche übrigen Schwermetallionen je nach ihrer Stellung in der Stabilitätsreihe mit dem vom Lycomarasmin herangebrachten Eisen in Konkurrenz (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1956).

### § 1. Die Wirkung des Lycomarasmins in Eisen-unterernährten Tomatenpflanzen

Bei den extrem Eisen-unterernährten Tomatensprossen der Eisen-Ernährungsstufe  $1/16\times$  beträgt nach Tabelle 3 der Eisengehalt der Stengel 1,17 mg je kg Lebendgewicht, d. s. rund ein Drittel des bei normaler Eisen-ernährung dort bestehenden Eisenspiegels. Entsprechend klein wird der Anteil an Eisenionen sein, der für den Vehikeffekt zur Verfügung steht.

Der Eisengehalt der Blätter stellt sich auf rund  $2/3$  des bei normaler Eisenernährung bestehenden Wertes; er ist derart niedrig, daß in den Blattgeweben schon spontan visuelle Eisenmangelnekrosen auftreten. In diese Mangelsituation schaltet sich nun zusätzlich das Lycomarasmin ein und entzieht auch den noch arbeitenden Wirkungssystemen des Wirtes ihr Eisenion. Die durch das Lycomarasmin in dieser Eisen-Ernährungsstufe ausgelösten Schädigungen sehen infolgedessen gleich aus wie die spontanen Eisenmangelschäden; sie gehen ja auch zu einem wichtigen Teil auf den von ihm erzeugten bzw. verstärkten Eisenmangel zurück.

### § 2. Die Wirkung des Lycomarasmins bei günstiger Eisenernährung der Tomatenpflanzen

Mit wachsender Eisenversorgung der Tomatensprosse verschieben sich sowohl in den Stengeln als in den Blättern die Voraussetzungen, unter denen die Lycomarasminmolekeln ihre gegenläufige Wirkung entfalten.

In den Stengeln steigt der gesamte Eisengehalt von 1,17 mg bei der Eisen-Ernährungsstufe  $1/16$  auf 1,91 mg bei der Stufe  $1/4$  und auf 2,54 mg bei der Stufe  $1/2\times$ , also um rund 60—100 % (Tabelle 3); entsprechend größer ist wohl auch die Menge des durch den Vehikeffekt aus den Stengelgeweben usw. in die Blätter transportierten Eisens.

In den Blättern steigt der gesamte Eisengehalt in diesen Eisen-Ernährungsintervallen relativ etwas langsamer an, nämlich nur um rund die Hälfte. Dieser Anstieg reicht gerade aus, um in ihnen die Eisenmangelnekrosen zum Verschwinden zu bringen; doch besteht in den betreffenden Pflanzen noch immer ein gewisser Eisenmangel; denn sie sind zarter gewachsen und heller gefärbt als in den reichlicher mit Eisen ernährten Serien. Dieser Eisenmangel wird jedoch durch die vom Lycomarasmin aus dem Stengel herangeführten und nunmehr freigesetzten oder abgetauschten Eisenionen in steigendem Maße gemildert.

Ähnlich günstig liegen in den Blättern die Voraussetzungen für die örtliche Chelierungswirkung des Lycomarasmins. Hier spielen zwei Faktorenguppen in positivem Sinne zusammen.

1. In den Blattgeweben steht rund die Hälfte mehr Eisen zur Verfügung als bei der Eisen-Ernährungsstufe  $1/16$ ; dementsprechend hat wohl auch ihr „Eisenhunger“ und damit die Tendenz, den aus dem Stengel heraufwandernden Lycomarasmin-Eisen-Komplexen das Eisenion wieder zu entreißen, abgenommen. Und

2. Wegen der rund 50%igen Erhöhung ihres autochthonen Eisengehaltes ertragen die Blätter den Eisentzug durch die noch aktionsfähigen Lycomarasminmolekeln leichter, d. h. sie sind für ihn toleranter geworden.

Wegen dieses günstigen Zusammenwirkens des Vehikeleffektes und des örtlichen Chelierungseffektes mit den blatteigenen Voraussetzungen nimmt die schädigende Wirkung der applizierten Lycomarasmindosis anfänglich mit steigender Eisernährung ab (linker Kurvenschenkel in Abb. 1) und erreicht schließlich ein Minimum, das (bezogen auf die Eisen-Ernährungsstufe  $1/16$ ) 57 % in der ersten Versuchsreihe (bei der Eisen-Ernährungsstufe  $1/4$ ) und 40 % in der zweiten Versuchsreihe (bei der Stufe  $1/2 \times$ ) beträgt. In diesem Minimum sind wohl zur Hauptsache jene Schädigungen enthalten, die durch andere Wirkungsmechanismen des Lycomarasmins als durch seine Fähigkeit, Schwermetallionen (insbesondere Eisenionen) zu chelieren, ausgelöst werden.

Wie groß mag im Bereich dieses Schädigungsminimums die Menge des vom Lycomarasmin aus dem Stengel in die Blätter verfrachteten Eisens gewesen sein? Um hierfür einen Anhaltspunkt zu gewinnen, gehen wir von unserer früheren Arbeit aus, in der wir die Schwankungen des Vehikeleffektes künstlich nachzuahmen suchten (GÄUMANN, NAEF-ROTH und KERN, 1955). Sämtliche Versuchspflanzen wurden dort gleich ernährt, nämlich (in bezug auf ihre Eisenversorgung) leicht suboptimal, etwas unterhalb unserer Eisen-Ernährungsstufe  $1/2 \times$ .

Entsprechend dieser konstanten Eisernährung darf angenommen werden, daß die in den Blattgeweben anlangenden Lycomarasminmolekeln dort stets ungefähr identische Verhältnisse antrafen; und anderseits darf angenommen werden, daß auch die Quote des vom Lycomarasmin unterwegs in den Stengeln usw. chelierten Eisens sich stets ungefähr gleich blieb.

Die Schädigungshöhe bei Verabreichung von reinem Lycomarasmin sei zu 100 % gesetzt. Die Lycomarasminmolekeln brachten in diesem Falle nur jene Eisenionen in die Blätter, die sie unterwegs im Stengel usw. cheliert hatten.

Wurden nun dem Lycomarasmin vor seiner Einführung in die Tomatensprosse („präinfektionell“) steigende Mengen von Eisenionen angelagert, so erfuhr dadurch der Vehikeleffekt eine künstliche Steigerung. Der Schädigungsindex der Tomatenblätter begann zunächst zu sinken; das Lyco-



marasmin wurde somit (wie bei der soeben besprochenen suboptimalen Eisernährung der Tomatenpflanzen) in den niederen Stufen der präinfektionellen Eisenanlagerung in zunehmendem Maße entgiftet.

Bei einer präinfektionellen Anlagerung von 0,008 mg Eisen je kg Lebendgewicht (d. s. weniger als 1 Promille des gesamten, in den betreffenden Versuchspflanzen vorhandenen Eisens) erreichte der Schädigungsindex den minimalen Wert von 93 %. Bei dieser Dosis hat je eine von rund 5500 Lycomarasminmolekeln, also statistisch eine verschwindend kleine Zahl der Lycomarasminmolekeln, präinfektionell ein Eisenion angelagert erhalten. Auch bezogen auf die Zahl der Blattzellen, auf die sich diese Eisengabe verteilt, ist sie homöopathisch klein. 0,008 mg Fe enthalten  $0,86 \cdot 10^{17}$  Ionen; anderseits enthält 1 kg Blattsubstanz nach einer Überschlagsrechnung von Herrn Kollegen A. FREY-WYSSLING rund  $10^{10}$ — $10^{11}$  Zellen; somit entfallen, gleichmäßige Verteilung vorausgesetzt, auf eine Blattzelle größenordnungsmäßig  $10^6$ — $10^7$  Eisenionen.

Dieser spurenhafte präinfektionelle Eisenzusatz, über das in konstanter Menge aus dem Stengel herangeführte wirtseigene Eisen hinaus, genügt jedoch, um unter den gegebenen Ernährungsverhältnissen der Versuchspflanzen das soeben geschilderte optimale Zusammenspiel der Voraussetzungen zu schaffen und die Schadwirkung der verabreichten Lycomarasmindosis auf ein Minimum sinken zu lassen.

Dies ist nur möglich, wenn sich die Menge des vom Lycomarasmin unterwegs in den Stengel- usw. -Gewebe chelierten wirtseigenen Eisens in einer ähnlichen Größenordnung bewegt wie das von uns präinfektionell angelagerte Fremdeisen. Nehmen wir willkürlich an, die Menge des vom Lycomarasmin verfrachteten wirtseigenen Eisens sei zehnmal größer gewesen als das von uns angelagerte Fremdeisen (was wahrscheinlich zu hoch gegriffen ist), so hätten die Lycomarasminmolekeln in den Stengelgeweben rund 0,08 mg Eisen je kg Lebendgewicht cheliert; somit hätte sich je eine von rund 500 Lycomarasminmolekeln unterwegs ein Eisenion angelagert. Dazu kommen die präinfektionell angelagerten 0,008 mg Eisen. Die Eisenmenge, die durch die verabreichte Lycomarasmindosis bei der Eisen-Ernährungsstufe  $\frac{1}{2} \times$  aus dem Stengel der Tomatensprosse in die Blätter verfrachtet wird, beträgt also größenordnungsmäßig 0,09 mg je kg Lebendgewicht.

Nach den Gehaltszahlen der Tabelle 3 ist in den Stengeln ein Eisenzug von 0,09 mg je kg Lebendgewicht durchaus möglich. Die Stengel enthalten ja in den Eisen-Ernährungsstufen  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{1}{2} \times$  2—2,5 mg Gesamteisen je kg Lebendgewicht; davon dürften sich nach den Berechnungen von S. 95 rund 25 %, also rund 0,5—0,6 mg, in einer reaktionsfähigen Form befunden haben; somit hätten die Lycomarasminmolekeln in den Stengelgeweben nur rund ein Zehntel des dort verfügbaren, reaktionsfähigen Eisens cheliert.

Erstaunlich ist bei diesen Berechnungen die Kleinheit der Eisenmenge, die im vorliegenden Reaktionsgeschehen den Ausschlag gibt. Um das Lycomarasmin unter den gegebenen Ernährungsverhältnissen der Versuchspflanzen maximal zu entgiften, genügt es, wenn je eine von rund 500 Molekeln ein Eisenion aus dem Stengel mit sich in die Blätter führt, d. h. wenn mit dem Transpirationsstrom 1 Lycomarasmin-Eisen-Komplex auf rund 500 noch aktionsfähige Lycomarasminmolekeln aus dem Stengel in die Blätter wandert. Es ist somit eine kleine Minderheit von Lycomarasminmolekeln, welche — weil sie sich ein Eisenion angelagert hat — durch dieses Eisenion bei der Prägung des Krankheitsbildes den Ausschlag gibt.

Bei einer derartigen Wirkungshöhe muß das Lycomarasmin bzw. müssen die Lycomarasmin-Eisen-Komplexe im Innern der Wirtszellen eng gezielt, streng spezifisch, ganz bestimmte Organellen und Wirkungssysteme schädigen. Welche es sind, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beurteilt werden. Doch muß es sich hierbei um viel sensiblere Mechanismen handeln, als sie z. B. in der Wasserpermeabilität der Protoplasten unmittelbar zur Auswirkung gelangen; denn diese wird erst deutlich verschoben, wenn je eine von rund 10 Lycomarasminmolekeln beim Eintritt in das Zellinnere ein Eisenion mit sich führt (GÄUMANN und BACHMANN, 1957).

### § 3. Die Wirkung des Lycomarasmins in Eisen-überernährten Tomatenpflanzen

Wird die Menge des in der Nährlösung dargebotenen Eisens über den soeben besprochenen günstigen Bereich hinaus gesteigert, nämlich bis auf das Achtfache der normalen Dosis, so steigt der Eisengehalt der Tomatenpflanzen bis auf nahezu 24 mg je kg Lebendgewicht (Tabelle 3). Die Pflanzen sind mit Eisen überfüttert und beginnen schon in der Eisenernährungsstufe  $1\times$  bzw.  $2\times$  spontan die in § 2 des 2. Kapitels geschilderten Eisenüberschwemmungsschäden zu zeigen.

In die ohnehin mit Eisen übersättigten Blattgewebe dieser Pflanzen bringen nun die Lycomarasminmolekeln aus dem Stengel (dessen Eisengehalt nach Tabelle 3 von 2,54 auf 4,07 mg, also fast auf das Doppelte, gestiegen ist) auch ihrerseits noch eine erhöhte Eisenfracht. Die durch die verabreichte Lycomarasmindosis in den Blättern ausgelösten Schädigungen nehmen deshalb zu; sie steigen quantitativ auf fast den dreifachen Betrag an (nämlich nach Tabelle 1 von 0,77 auf 2,16 in der ersten und von 0,44 auf 1,23 in der zweiten Versuchsreihe) und entsprechen qualitativ vollkommen den Symptomen der Eisenüberschwemmungsschäden. Bei den Eisen-überernährten Tomatenpflanzen wird deshalb das Krankheitsbild nicht in erster Linie durch die Lycomarasminmolekeln geprägt (obschon diese gegenüber den Eisenionen einige Hundertfach in der Überzahl sind), sondern in erster Linie durch die von ihnen herangeführten Eisenionen.

Die vorliegenden Versuche bestätigen somit (für den Fall des Eisens) die eingangs dargelegte Arbeitshypothese, wonach wichtige Schädigungsmechanismen des Lycomarasmins auf seiner Fähigkeit beruhen, mit Schwermetallionen des Wirtes zyklische Komplexe zu bilden und je nach dem Ionenbedarf und der Ionenempfindlichkeit der verschiedenen Organellen und Wirkungssysteme des Wirtes nebeneinander her in ein und derselben Wirtszelle Mangel- und Überschwemmungsschäden auszulösen.

Je nach dem Ausmaß der Eisenernährung der Tomatenpflanzen, d. h. je nach der Menge des in ihnen zur Verfügung stehenden reaktionsfähigen Eisens dominiert in ihren Blattgeweben die eine oder die andere dieser Schädigungen. Das Schädigungsbild, das ein und dieselbe Lycomarasmin-dosis in unterschiedlich mit Eisen ernährten Tomatenpflanzen hervorruft, erfährt deshalb mit wachsender Eisenversorgung weitgehende Verschiebungen: Quantitativ durchläuft es mit wachsender Eisenversorgung der Wirtspflanzen eine Minimumkurve, und qualitativ werden bei den Eisen-unterernährten Tomatenpflanzen die Eisenmangelnekrosen verstärkt und bei den Eisen-überernährten Tomatenpflanzen die Eisenüberschwemmungsschäden.

Die Reaktionslage der Tomatenpflanzen gegenüber dem Lycomarasmin wird somit schon durch verhältnismäßig kleine Schwankungen in ihrem Eisenspiegel weitgehend verschoben. Eine „richtige“ Ernährung mit Schwermetallionen (im vorliegenden Falle mit Eisen) stellt deshalb einen wichtigen Faktor ihrer Toxinresistenz und damit ihrer Krankheitsresistenz dar: „Richtig“ mit Eisen ernährte Tomatenpflanzen sind Lycomarasmin-widerstandsfähiger als Eisen-unterernährte und Eisen-überernährte Exemplare.

Die Sensibilität der Tomatenpflanzen für das Lycomarasmin wird also durch die unterschiedliche Eisenernährung gerade im umgekehrten Sinne verschoben wie durch die unterschiedliche Stickstoffernährung: Normal mit N ernährte Tomatenpflanzen sind (im Gegensatz zu normaler Eisenernährung) für das Lycomarasmin weit empfindlicher als N-unterernährte und N-überernährte Exemplare, während andererseits Schwankungen in der Phosphorsäure- und Kaliversorgung in dieser Hinsicht keine meßbare Rolle spielen (ZÄHNER, 1955).

Die hier besprochene antagonistische Wirkung, welche die Schwermetallionen in einem bestimmten Konzentrationsbereich auf das Lycomarasmin ausüben, eröffnet vielleicht auch einen Ausblick auf gewisse Nebenwirkungen der eisen- und kupferhaltigen Pflanzenschutzmittel.

Bei ungefähr normal ernährten Tomatenpflanzen genügt ja eine zusätzliche Eisengabe von 0,008 mg je kg Lebendgewicht bzw. von  $10^6$ – $10^7$  Eisenionen je Blattzelle, um das Lycomarasmin im Eisensektor maximal zu entgiften. Derartige homöopathisch kleine Metallmengen vermögen jedoch aus dem Spritzbelag der Blattoberfläche in das Blattinnere zu permeieren.



Nach RECKENDORFER (1947) dringen im Verlaufe von 48 Stunden aus einer 0,012%igen Kupfersulfatlösung (also unter extremen Bedingungen) größenordnungsmäßig  $10^{-9}$  mg Cu je Zelle in das Innere von Bohnenblättern; d. s. rund  $10^{10}$  Kupferionen je Zelle, also rund  $10^3$ — $10^4$  mal mehr Kupferionen als beim Schädigungsminimum des Lycomarasmins die zusätzliche Quote der Eisenionen betrug. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß es nach GÄUMANN und NAEF-ROTH (1956) rund 5000 mal mehr Kupferionen als Eisenionen braucht (nämlich 1000 Milliaequivalente Cu gegenüber 0,18 Milliaequivalenten Fe) um das Lycomarasmin maximal zu entgiften; die RECKENDORFERSchen Zahlen bewegen sich deshalb in einer biologisch möglichen Größenordnung.

Was hier für das Lycomarasmin herausgearbeitet wurde, gilt mutatis mutandis wohl auch für die übrigen chelatbildenden phytopathogenen Toxine, so für die Fusarinsäure. Die Schwermetallsalze, die im Pflanzenschutz als Spritzmittel verwendet werden, haben deshalb wahrscheinlich eine doppelte Wirkung; zur Hauptsache wirken sie fungizid oder fungistatisch und bekämpfen die Keimung und Entwicklung des Erregers; als Nebenwirkung hemmen sie aber nach der vorliegenden Arbeitshypothese in bestimmten Konzentrationsbereichen überdies auch seine Toxine. Mit dieser Auffassung würde in Einklang stehen, daß die Bespritzung mit Kupferpräparaten nach schwer zu überprüfenden Beobachtungen gewisser Praktiker nicht nur die Erkrankungs häufigkeit der Wirtspflanzen herabsetzen soll (Hemmung des Erregers), sondern überdies auch ihre Krankheitsempfindlichkeit, d. h. ihre Empfindlichkeit für die Toxine des eingedrungenen Erregers.

### Zusammenfassung

Tomatenpflanzen wurden in Wasserkultur unter sonst konstanten Bedingungen, jedoch mit steigenden Eisenzusätzen, herangezogen. Die Schädigungen, die eine bestimmte Dosis Lycomarasmin bei ihnen hervorruft, durchlaufen mit steigender Eisernährung quantitativ eine Minimumkurve (Abb. 1, mit einem ausgesprochenen Tiefpunkt bei  $\frac{1}{4}$  bzw.  $\frac{1}{2}$  der „normalen“ Eisenversorgung) und schlagen qualitativ von den Symptomen der Eisenmangelschäden zu den Symptomen der Eisenüberschwemmungsschäden um (mit einem engen Umschlagsbereich bei der einfach- bis doppelt normalen Eisenversorgung; Tabelle 1).

Bei extrem Eisen- u n t e r ernährten Tomatenpflanzen ( $\frac{1}{16}$  normal) ist der Eisenspiegel der Blätter derart niedrig, daß in ihnen schon spontan visuelle Eisenmangelnekrosen auftreten. In diese Mangelsituation schaltet sich nun zusätzlich das Lycomarasmin ein und entzieht auch den noch arbeitenden Wirkungssystemen des Wirtes ihr Eisenion. Die durch das Lycomarasmin in dieser Eisen-Ernährungsstufe ausgelösten Schädigungen sehen infolgedessen gleich aus wie die spontanen Eisenmangelschäden; sie gehen ja



zu einem wichtigen Teil auf den von ihnen erzeugten bzw. verstärkten Eisenmangel zurück.

Mit wachsender Eisenversorgung der Tomatenpflanzen nimmt der Eisengehalt ihrer Blätter zu (Tabelle 3) und dementsprechend ihr akuter „Eisenhunger“ ab; anderseits wächst auch der Eisengehalt der Stengel und mit ihm die Quote des vom Lycomarasmin durch den Vehikeleffekt herangebrachten Eisens. Diese zusätzlich herangeführten Eisenionen mildern einerseits in steigendem Maße den in den Blattgeweben noch bestehenden Eisenmangel und wirken anderseits dem örtlichen Chelierungseffekt des Lycomarasmins entgegen; das Ausmaß der durch die verabreichte Lycomarasmindosis ausgelösten Schädigungen (die ja zu einem wichtigen Teil künstlich erzeugte Eisenmangel-schäden sind) fällt deshalb anfänglich mit steigender Eisernährung ab (linker Kurvenschenkel in Abb. 1).

Wenn die verabreichte Lycomarasmindosis rund 0,09 mg Eisen je kg Lebendgewicht aus dem Stengel in die Blätter transportiert, so erreicht der Schädigungsindex der Blätter einen minimalen Wert, der etwa 40—60 % des Ausgangswertes beträgt (Tabelle 1). In diesem Minimum sind wohl zur Hauptsache jene Schädigungen enthalten, die durch andere Wirkungsmechanismen des Lycomarasmins als durch seine Fähigkeit, Schwermetallionen (insbesondere Eisenionen) zu chelieren, ausgelöst werden.

Bei noch weiter zunehmender Eisernährung werden die Blattgewebe in steigendem Maße mit Eisen übersättigt; anderseits führen auch die Lycomarasminmolekeln aus dem Stengel (dessen Eisengehalt auf rund das Doppelte gestiegen ist) eine erhöhte Eisenfracht heran. Die durch die verabreichte Lycomarasmindosis in den Blättern ausgelösten Schädigungen steigen deshalb quantitativ allmählich auf fast den dreifachen Betrag des Minimums (rechter Kurvenschenkel der Abb. 1) und schlagen überdies bei der Eisen-Ernährungsstufe  $2\times$  qualitativ in die Symptome der Eisenüberschwemmungsschäden um.

Bei den Eisen- u n t e r ernährten Tomatenpflanzen werden somit durch die verabreichte Lycomarasmindosis die Eisen m a n g e l nekrosen verstärkt und bei den Eisen- ü b e r ernährten Tomatenpflanzen die Eisen ü b e r s c h w e m m u n g s schäden.

Die Reaktionslage der Tomatenpflanzen gegenüber dem Lycomarasmin wird also schon durch verhältnismäßig kleine Schwankungen in ihrem Eisenspiegel weitgehend verschoben. Eine „richtige“ Ernährung mit Eisen und anderen Schwermetallionen stellt deshalb einen wichtigen Faktor ihrer Toxinresistenz und damit ihrer Krankheitsresistenz dar. Anderseits können kleine Metallmengen, wie sie bei der Lycomarasminempfindlichkeit der Tomatenpflanzen den Ausschlag geben ( $10^6$ — $10^7$  Eisenionen je Blattzelle) auch aus dem Spritzbelag in das Blattinnere permeieren. Die Eisen- und Kupfersalze, die im Pflanzenschutz als Spritzmittel verwendet werden, besitzen deshalb möglicherweise eine doppelte Wirkung; zur Hauptsache wirken sie fungizid oder fungistatisch und bekämpfen die Keimung und Entwicklung des E r r e g e r s; als Nebenwirkung hemmen sie aber in bestimmten Konzentrationsbereichen überdies auch seine T o x i n e.

### Summary

The pathogenic effect of lycomarasmin on the leaf tissues of tomato plants is partly due to its capacity to chelate heavy-metal ions in the host cells. In the tissues of the tomato leaves two antagonistic effects are superimposing each other, namely

1. the local chelating effect: The majority of the lycomarasmin molecules arrive in the leaves in non saturated condition, remove the heavy-metal ions from certain enzymatic systems and thereby cause local deficiencies in the cell, and

2. the vehicle effect: certain lycomarasmin molecules chelate on their way through the stems etc. those heavy-metal ions which there are linked with weaker chelating agents or are directly present as ions and form with them the lycomarasmin-heavy metal-complexes. So far as these complexes are soluble in water (as is e. g. the case with lycomarasmin-iron-complexes) they are transported into the leaf tissues by the transpiration stream as are the non-saturated lycomarasmin molecules. Here part of them decompose, e. g. on account of photochemical effects or exchange by more potent chelating agents of the cell. By these processes the heavy-metal ions are set free in the "wrong" place and produce local flooding injuries in sensitive working systems of the host cells.

This working hypothesis is examined in the present paper. Experiments were done on tomato plants grown in water culture under constant conditions but with increasing additions of iron. The injurious effects produced by a certain dose of lycomarasmin with iron nutrition increased follow a minimum curve (Fig. 1) with a distinct minimum at  $1/4$  and  $1/2$  of normal iron supply respectively. Qualitatively, they show first the symptoms of iron deficiency and then the injuries of iron flooding injuries — the symptom turning area being at the normal or double-normal level of iron supply (Table 1).

In extremely undernourished tomato plants ( $1/16$  normal) the level of iron content of the leaves is so low that visible spontaneous deficiency necroses occur. In addition to this deficiency, lycomarasmin comes in and deprives the enzymatic systems of the host of their iron ion. The injuries caused by lycomarasmin at this degree of iron nutrition resemble therefore the spontaneous iron-deficiency injuries.

With increasing supply of iron the iron content of the leaves of the tomato plants also increases (Table 3) and their acute need for iron decreases; on the other hand, the iron content of the stems and, along with it, the quota of the iron brought in by lycomarasmin through the vehicle effect increases. The additional iron ions decrease on the one hand the iron deficiency in the leaf tissues and counteract on the other hand the local chelating effect of the lycomarasmin. The degree of the injuries caused by the lycomarasmin dose — which are for a considerable part artificially produced deficiency-injuries — is therefore initially reduced with increasing iron supply (left part of the curves in Fig. 1).

If the lycomarasmin dose transports 0,09 mg iron per 1 kg living weight from the stem into the leaves, the injury-index of the leaves reaches a minimum value, which is c. 40—60 % of the initial value (Table 1). This minimum corresponds more or less to the injuries which are caused by other mechanisms of the lycomarasmin than by its ability to chelate heavy metal ions, especially iron ions.

With the iron nourishment increasing, the leaf tissues are increasingly saturated with iron. On the other hand, the lycomarasmin molecules bring in a greater supply of iron from the stem (whose iron content has almost doubled). The injuries caused by the lycomarasmin dose in the leaves are gradually increased to three times the minimum (right part of the curve in Fig. 1) and, moreover, they are qualitatively changed into the symptoms of iron flooding injuries at the iron supply level  $2\times$ .

Thus the lycomarasmin dose aggravates the iron deficiency necroses in iron-undernourished tomato plants whilst in iron-overnourished tomato plants it intensifies the iron flooding injuries.

As the reactionability of tomato plants to lycomarasmin is altered by comparatively slight fluctuations of their iron content, an appropriate nourishment with iron or other heavy-metal ions constitutes an important factor of their resistance to toxin and therefore of their resistance to disease. On the other hand, such small quantities of metal as are decisive with the lycomarasmin sensitiveness of tomato plants ( $10^6$ — $10^7$  iron ions per leaf cell) can permeate into the leaf from the spray layer. Thus iron and copper salts as used in plant-protecting sprays may possibly have a double effect. They operate mainly as fungicides or fungistatics and counteract the germination and development of the causing agent; as a secondary effect they counteract in certain degrees of concentration its toxins.

### Literaturverzeichnis

- DEUEL, H., 1954: Über Störungen des Spurenelementhaushaltes der Pflanzen durch Welketoxine. *Phytopath. Z.* **21**, 337—348.
- GÄUMANN, E. und E. BACHMANN, 1957: Über den Einfluß des Lycomarasmins und seiner Schwermetallkomplexe auf die Wasserpermeabilität pflanzlicher Protoplasten. *I. c.* **29**, 265—276.
- — und ST. NAEF-ROTH, 1956: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. IV. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit verschiedenen Schwermetallionen. *I. c.*, **25**, 418—444.
- — — und H. KERN, 1955: Über die chelierende Wirkung einiger Welketoxine. III. Die Verschiebungen der Toxizität durch steigende Absättigung mit Eisenionen. *I. c.*, **24**, 373—406.
- INGALLS, R. A. and J. W. SHIVE, 1931: Relation of H-ion concentration of tissue fluids to the distribution of iron in plants. *Plant Physiol.* **6**, 103—125.
- LIEBICH, H., 1941: Quantitativ-chemische Untersuchungen über das Eisen in den Chloroplasten und übrigen Zellbestandteilen von *Spinacia oleracea*. *Z. f. Bot.* **37**, 129—157.

- RECKENDORFER, P., 1947: Immunisierung als Folge von Schädlingsbekämpfung. Pflanzenschutz-Berichte **1**, 65—81.
- SCHEFFER, R. P. and J. C. WALKER, 1953: The physiology of *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology **43**, 116—125.
- SNELL, F. D. and C. T. SNELL, 1936: Colorimetric methods of analysis. Van Nostrand, New York, **1**, S. 168.
- STOUT, P. R. and D. I. ARNON, 1939: Experimental methods for the study of the role of copper, manganese and zinc in the nutrition of higher plants. Amer. J. Bot. **26**, 144—149.
- SZALKOWSKI, CHR. R. and H. A. FREDIANI, 1950: Determination of iron in cereals, flour and bread. Cereal Chemistry **27**, 141—149.
- WONG, S. Y., 1922: Colorimetric determination of iron and hemoglobin in blood. J. Biol. Chem. **55**, 421—425.
- ZÄHNER, H., 1955: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **23**, 49—88.



# Physiologisch-chemische Untersuchungen mit Weizensteinbrandsporen

## II. Atmung

Von

F. PICHLER

In Fortsetzung der physiologisch-chemischen Untersuchungen mit Sporen von Weizensteinbrand (*Tilletia tritici*) (PICHLER 1954) wurde der Einfluß verschiedener Faktoren, vor allem aber von Saatgutbeizmitteln, auf den Sauerstoffverbrauch keimender Sporen eingehender festgestellt. Bekanntlich ist die Keimung der Weizensteinbrandsporen von den vorherrschenden Sauerstoffverhältnissen stark abhängig. Namentlich die in dieser Hinsicht ersten eingehenden Untersuchungen des Einflusses des Sauerstoffes auf die Sporenkeimung von RABIEN (1927) haben den Nachweis erbracht, daß der jeweilige Sauerstoffgehalt das Keimverhalten der Steinbrandsporen bestimmt. Es muß daher die Menge an Sauerstoff, welche Weizensteinbrandsporen bei ihrer Keimung verbrauchen, eine große Rolle spielen und eine Verminderung der Keimfähigkeit in einer Verkleinerung des Sauerstoffverbrauches zum Ausdruck kommen.

### Methodik

Bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauches keimender Weizensteinbrandsporen liegt insofern eine Schwierigkeit vor, als die Sporen nicht vollkommen steril zur Untersuchung verwendet werden können. Da jedoch der Sauerstoffverbrauch der Steinbrandsporen bei ihrer Keimung verhältnismäßig sehr groß ist, kann der geringe Bedarf an Sauerstoff, der durch die Atmung anderer Mikroorganismen, vor allem von Bakterien, entsteht, vernachlässigt werden, wenn die Versuche in kürzerer Zeit (zwei Tage) und bei tieferen, jedoch für die Steinbrandsporen optimalen Temperaturen (10 °C) durchgeführt werden.

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches der zu prüfenden Steinbrandsporen können diese auf 1%igem Wasseragar in einem geeigneten Rezipienten zum Keimen gebracht werden. Nach einer bestimmten Zeit wird die Luft des Rezipienten auf Sauerstoff- und Kohlensäuregehalt bestimmt. Diese Methode ist aber nicht nur umständlich, sondern bereitet auch bei der notwendigen gleichmäßigen Verteilung einer genau abgewogenen Sporenmenge auf den Nährboden einige Schwierigkeiten. Nach weiteren, methodisch vielfach geänderten Vorversuchen, die hier nicht angeführt werden sollen, wurde schließlich folgende, leicht auszuführende Methode, die eine besondere Apparatur nicht benötigt, verwendet.

Je 0,1 g von den zu prüfenden Sporen wurden in eine sogenannte Winklerflasche von etwa 300 ml Inhalt gegeben und hierauf die Flasche mit dest. Wasser, das vorher gut durchgeschüttelt worden war, vollkommen aufgefüllt. Die mit einem eigenen Glasstöpsel verschlossene Flasche kam dann für die Dauer von 48 Stunden in einen Kühlschrank bei

einer Temperatur von 10° C und bei künstlicher Beleuchtung. Während dieser Zeit wurde die Flasche nach 24 Stunden einmal gut durchgeschüttelt. Nach zwei Tagen wurde unter Vermeidung einer Erschütterung der Flasche ein Teil des oberhalb der Sporen befindlichen Wassers mit Hilfe eines geeigneten Glashebers in eine kleinere Winklerflasche von ungefähr 100 ml Inhalt hinübergesaugt. Hierauf erfolgte die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes im Wasser nach WINKLER.

Sollte der Einfluß einer Beizflüssigkeit auf den Sauerstoffverbrauch geprüft werden, so wurden 0,2 g Sporen mit 10 ml Beizflüssigkeit gut aufgeschwemmt und eine bestimmte Zeit (15 bis 30 Minuten) in der Lösung gelassen. Am Ende der Beizdauer wurde die Sporenaufschwemmung auf ein angefeuchtetes Filter in einer Nutsche gegossen und die Beizflüssigkeit vollkommen abgesaugt. Nachdem die Sporen mit dest. Wasser mehrmals gewaschen worden waren, kam das Filter mit den Sporen für die Dauer von 48 Stunden in einen Exsikkator zum Trocknen. Für die weitere Untersuchung wurden vom Filter mit einem kleinen Skalpell genau 0,1 g Sporen genommen.

### Versuche

Durch die folgenden Untersuchungen sollte der Einfluß verschiedener Faktoren wie Alter, Sortenherkunft und Beizung auf den Sauerstoffverbrauch von Weizensteinbrandsporen festgestellt werden.

Für die ersten Untersuchungen stand Sporenmaterial bis aus dem Jahre 1923 zur Verfügung. Die verschiedenen Jahrgänge haben bei der Untersuchung im Jahre 1955 folgenden Sauerstoffverbrauch nach 2 Tagen ergeben:

Sauerstoffverbrauch von 0,1 g Sporen  
während 48 Stunden

Jahrgang	in mg	in ‰
1954	0,506	64,7
1953	0,324	41,5
1952	0,297	38,0
1951	0,069	8,8
1950	0,098	12,5
1948	0,055	7,0
1940	0,082	10,0
1935	0,125	15,2
1930	0,101	12,3
1927	0,048	5,8
1923	0,036	4,4

Aus den angeführten Zahlen ergibt sich, daß der Sauerstoffverbrauch mit zunehmendem Alter der Sporen rasch kleiner wird. Daß auch bei ganz alten Sporen, die sicherlich nicht mehr leben, ein Sauerstoffverbrauch bis zu 15 ‰ feststellbar war, dürfte auf einer Sauerstoffabsorption durch die Sporensubstanz beruhen. Vielleicht ist auch bei älterem, schon abgestorbenem Sporenmaterial die Entwicklung von Mikroorganismen stärker. Der bei der Untersuchung festgestellte Sauerstoffverbrauch setzt sich daher nicht nur aus der Atmung der Sporen, sondern auch aus der der Begleitmikroorganismen, namentlich aber aus der Sauerstoffabsorption der Sporensubstanz zusammen. Es muß daher immer von der ermittelten Sauerstoffabnahme ein Teil in Abzug gebracht werden, der durch andere Faktoren als durch die Atmung der Sporen verursacht wurde. Der störende Einfluß anderer Mikroorganis-

men kann bei manchen Untersuchungen dadurch vermieden werden, daß statt dest. Wassers eine  $10^{-5}$  mol  $\text{HgCl}_2$ -Lösung verwendet wird (5 ml einer 0,1%igen  $\text{HgCl}_2$ -Lösung in 2 Liter dest. Wasser). Auch ein Tropfen Toluol zum Wasser hat weder den Sauerstoffverbrauch noch den Gang der Bestimmung beeinflusst, wie durch eingehende Versuche festgestellt werden konnte.

Wenn der Sauerstoffverbrauch bei 4 Jahre alten Sporen nach 2 Tagen bereits sehr stark gesunken ist, so muß dies keineswegs ein Absterben der Sporen bedeuten, wie aus den folgenden Untersuchungen ersichtlich ist, bei denen der Sauerstoffverbrauch der Sporen nicht nur nach 2, sondern auch nach 4 und 6 Tagen gemessen wurde.

Die Atmung älterer Sporen wird daher mit zunehmendem Alter immer mehr verzögert, die Atmungsintensität nimmt jedoch vorläufig nicht ab, eine Erscheinung, die natürlich auch in der Keimung der Sporen zum Ausdruck kommen muß.

Ferner wurde der Sauerstoffverbrauch von Weizensteinbrandsporen gleichen Alters, jedoch von verschiedenen, teils wenig, teils sehr anfälligen Wirtspflanzen (Winterweizen) desselben Standortes untersucht. Zweck dieser Untersuchungen war auch zu ermitteln, ob verschiedener Sauerstoffverbrauch einen Unterschied in der Aggressivität der Sporen anzeigt. Der Sauerstoffverbrauch war folgender:

Sauerstoffverbrauch von 0,1 g Sporen während 48 Stunden

Wirtspflanze	in mg	in %
Admonter Früh	0,287	33,3
Austro Bankut	0,291	33,8
Firlbeck	0,253	29,1
Kadolzer Z	0,519	59,6
Reichersberger Kolben	0,448	52,0
Ritzlhofer Neu	0,328	37,7
Steier. Plantahofer	0,282	32,8
Stamm 101	0,289	33,2
Tassilo	0,301	34,6
Walthari	0,341	39,2

Sauerstoffverbrauch von 0,1 g Sporen

	in mg	in %
Jahrgang 1950		
nach 2 Tagen	0,100	10,9
nach 4 Tagen	0,917	100,0
Jahrgang 1948		
nach 2 Tagen	0,090	9,8
nach 4 Tagen	0,449	49,0
nach 6 Tagen	0,917	100,0

Der Sauerstoffverbrauch der verschiedenen Sporenherkünfte ist zum Großteil ziemlich gleich und die auftretenden Unterschiede dürften sicherlich innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler, die unvermeidbar sind, liegen, auf keinen Fall stehen sie aber mit der Verschiedenheit der Sortenanfälligkeit in einem Zusammenhang. Selbstverständlich wird ein keimkräftigeres Sporenmaterial stärker atmen, ob jedoch die Keimfreudigkeit nur auf den Einfluß der Wirtspflanze und

nicht auf verschiedenen anderen Faktoren beruht, ist sehr zweifelhaft.

Von besonderem Interesse war der Einfluß der Saatgutbeize auf den Sauerstoffverbrauch gebeizter Sporen. Für diese Untersuchungen gelangten sowohl anorganische, als auch organische Hg-Verbindungen in Form der im Handel befindlichen Saatgutbeizmittel zur Verwendung, wobei auch noch Formaldehyd miteinbezogen wurde.

Beizmittel	Beiz- konzentration	Beizdauer in Minuten	Sauerstoffverbrauch von 0,1 g Sporen während 48 Stunden	
			in ‰	in mg
Wasser .....	—	30	0,613	72,8
HgBr <sub>2</sub> .....	1/200 mol	30	0,040	4,1
HgCl <sub>2</sub> .....	1/200 mol	30	0,157	6,5
Ceresan Naßbeize .....	0,5 ‰	30	0,062	7,4
Ceresan Naßbeize .....	0,25 ‰	30	0,071	8,4
Ceresan Naßbeize .....	0,1 ‰	30	0,151	17,2
Ceresan Naßbeize .....	0,05 ‰	30	0,206	23,5
Ceresan Naßbeize .....	0,01 ‰	30	0,441	50,2
Duphar Naßbeize .....	0,1 ‰	30	0,045	5,6
Duphar Naßbeize .....	0,05 ‰	30	0,152	18,9
Duphar Naßbeize .....	0,01 ‰	30	0,401	49,9
Formaldehyd .....	0,1 ‰	15	0,383	43,6

Durch die Behandlung der Sporen mit einer 1/200 molaren HgBr<sub>2</sub>- oder HgCl<sub>2</sub>-Lösung, sowie mit einer 0,1<sup>o</sup>/oigen Duphar-Naßbeiz- oder 0,25 bis 0,5<sup>o</sup>/oigen Ceresan-Naßbeiz-Lösung während 30 Minuten Beizdauer wurde die Sporenatmung verhindert, da der geringe Verbrauch an Sauerstoff nicht mehr durch diese verursacht wurde. Mit sinkendem Gehalt der Beizlösung an Ceresan-Naßbeize nimmt der Sauerstoffverbrauch zu, ist jedoch bei der zur Saatgutbeize vorgeschriebenen Konzentration von 0,1 ‰ noch so gering, daß ein Keimen der Sporen nicht stattfindet. Bei den mit 0,1<sup>o</sup>/oiger Formaldehyd-Lösung behandelten Sporen ist nach 15 Minuten Beizdauer der Sauerstoffverbrauch schon so groß, daß unter Umständen ein geringes Keimen der behandelten Sporen erfolgen könnte.

Schwieriger gestaltet sich die Prüfung des Einflusses von Trockenbeizmitteln auf den Sauerstoffverbrauch der Brandsporen. Für diese Untersuchungen wurden zu 0,1 g Sporen 0,04 g des zu prüfenden Trockenbeizmittels hinzugegeben. Nach 48stündigem Aufenthalt im Kühlschrank bei 10 ° C und künstlicher Beleuchtung wurde die zu untersuchende Wassermenge von ungefähr 100 ml vorsichtig von den Sporen und dem Beizmittel in die Untersuchungsflasche abgehebert. Außerdem wurde festgestellt, ob das zu prüfende Trockenbeizmittel allein den Gang der Sauerstoffbestimmung beeinträchtigt.

Beizmittel	Aufwandmenge	Sauerstoffverbrauch von 0,1 Sporen während 48 Stunden	
		in mg	in ‰
Wasser .....	—	0,767	92,7
Ceresan Trockenbeize ....	0,04 g	0,367	44,3
Germisan Trockenbeize ..	0,04 g	0,439	53,0
Gervit Trockenbeize .....	0,04 g	0,493	59,6

Durch den Trockenbeizmittelzusatz von 0,04 g zu 0,1 g Sporen sinkt der Sauerstoffverbrauch der Sporen auf ungefähr die Hälfte des Verbrauches von Sporen ohne Beizmittelzusatz, wobei ein deutlicher Unterschied zwischen den angewendeten Beizmitteln nicht zu bemerken war.



### Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß wohl das Alter der Sporen, jedoch nicht die Sporenherkunft den Sauerstoffverbrauch keimender Brandsporen beeinflusst. Ältere Sporen atmen am Anfang der Untersuchung längere Zeit nicht oder nur sehr gering, zeigen aber im späteren Verlauf der Untersuchung noch intensive Atmungstätigkeit. Diese Verzögerung der Atmung tritt dann im Keimverhalten der Sporen in Erscheinung. Nach den Untersuchungen von RABIEN (1927) fällt nämlich die Keimgeschwindigkeit und Keimfähigkeit mit zunehmendem Alter der Sporen, indem die Keimgeschwindigkeit nach 2 Jahren merklich sinkt, wobei dann auch eine Abnahme der Keimfähigkeit folgt. Fünfjährige Sporen keimten nach RABIEN bei starker Verzögerung nur mehr sehr schwach (ungefähr 1 %). Ähnlich wie bei den Samen können also lebende, relativ stark atmende Sporen keimunfähig sein und daher für eine Krankheitsinfektion nicht mehr in Frage kommen. Ein Nachlassen der Keimfähigkeit der Sporen kommt deshalb nicht so sehr in der Atmungsintensität als in der Atmungsverzögerung zum Ausdruck.

Selbstverständlich ist der Einfluß von Beizmitteln auf den Sauerstoffverbrauch behandelter Sporen stark. Bei der üblichen Beizkonzentration von 0,1 % und bei einer Beizdauer von 30 Minuten atmen mit stark wirksamen Hg-Verbindungen wie Quecksilberbromid, Quecksilberchlorid oder Äthylquecksilberverbindungen behandelte Sporen überhaupt nicht mehr. Bei anderen Hg-Verbindungen, wie sie in manchen bewährten Beizpräparaten vorliegen, ist bei der üblichen Beizkonzentration und Beizdauer die Atmung schon so stark unterbunden, daß ein Keimen der gebeizten Sporen nicht mehr erfolgt. Dabei muß noch berücksichtigt werden, daß durch das gründliche Waschen der Sporen nach der Behandlung die Nachwirkung der Beize (2. Beizphase nach PICHLER) vollkommen aufgehoben wurde, ein Umstand, der vielleicht gerade bei der Formaldehydbehandlung eine stärkere Atmung zur Folge hatte.

Wenn durch den Trockenbeizmittelzusatz der Sauerstoffverbrauch der Sporen nur ungefähr auf die Hälfte gesunken ist, ist zu bedenken, daß dieser geringe Zusatz von 0,04 g Trockenbeizmittel einer Lösung mit ungefähr 0,001 g Hg-Gehalt entsprochen hatte unter der Voraussetzung, daß sich die Hg-Verbindung während der Untersuchung vollkommen gelöst hätte. Wie jedoch bereits erwähnt, beeinflussen Lösungen mit 0,0002 % Hg-Gehalt den Sauerstoffverbrauch der Sporen überhaupt nicht mehr.

Der mögliche Einwand, daß im Wasser untergetauchte Sporen nicht oder nur sehr schlecht keimen, ist nicht gerechtfertigt. Die sehr sauerstoffbedürftigen Sporen keimen wohl unter Wasser, aber nur solange als ihnen der im Wasser vorhandene freie Sauerstoff noch zur Verfügung steht, was verhältnismäßig nur kurze Zeit der Fall ist. Deren Dauer ist von verschiedenen Faktoren wie Wasser- und Sporenmenge, Wassertemperatur u. a. abhängig. Es kommt daher meistens zu keinem sichtbaren Keimen der Sporen. Jede Schädigung der Brandsporen muß aber gerade am Beginn der Kei-

mung am deutlichsten in Erscheinung treten, wie wir es bei der verzögerten Atmung älterer Sporen schon bemerken konnten.

Durch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches keimender Brandsporen haben wir eine einfache Methode, mit Hilfe der wir rasch (innerhalb 2 Tagen) und ohne Mikroskop die Wirkung zu prüfender Präparate auf die Keimung der behandelten Sporen untersuchen können, vorausgesetzt, daß diese den Gang der Sauerstoffbestimmung nicht beeinträchtigen.

### Zusammenfassung

1. Es wird eine einfache Methode beschrieben, die es ermöglicht, den Sauerstoffverbrauch keimender Weizensteinbrandsporen zu ermitteln.
2. Infolge des bekannt großen Sauerstoffbedürfnisses keimender Brandsporen kommt jede Keimverminderung in einer Änderung des Sauerstoffverbrauches zum Ausdruck, die sowohl in einer Abnahme der Atmungsintensität als auch in einer Atmungsverzögerung in Erscheinung treten kann.
3. Das Alter der Sporen, nicht aber ihre Herkunft, beeinflussen den Sauerstoffverbrauch.
4. Eine Behandlung mit Saatgutbeizmitteln bei der üblichen Beizkonzentration und Beizdauer unterbindet je nach dem Wirkstoff die Atmung der Sporen ganz oder so stark, daß ein Keimen der behandelten Sporen nicht mehr erfolgt.
5. Die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches keimender Brandsporen ist ein Mittel, mit dessen Hilfe die Wirkung neu zu erprobender Präparate rasch und ohne Mikroskop festgestellt werden kann.

### Literaturverzeichnis

- PICHLER, F., 1954: Physiologisch-chemische Untersuchungen mit Weizensteinbrandsporen. I. Katalasenaktivität. Pflanzenschutz-Ber. **12**, 73—87.
- RABEN, H., 1927: Über Keimungs- und Infektionsbedingungen von *Tilletia tritici*. Arb. a. d. Biolog. Reichsanstalt f. Land- u. Forstw. **15**, 297—353.

## Kurze Mitteilung

*Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Universität Bonn*

*Direktor: Prof. Dr. H. Kick*

### Über den Einfluß der Kieselsäure auf den Mehлтаubefall von Getreide bei unterschiedlicher Stickstoffdüngung

Von

E. GROSSE-BRAUCKMANN

Die Stärke des Mehлтаubefalls bei Getreide wird durch die Mineralstoffernährung in starkem Maße beeinflusst (1, 2, 3, 4, 5). Nach diesen Arbeiten kommt dabei dem Stickstoff eine fördernde Wirkung zu, die so stark ist, daß die Praxis vor hohen N-Gaben in gefährdeten Lagen gewarnt wird (7). Andererseits wird auf eine Erhöhung der Resistenz durch eine Kieselsäuregabe hingewiesen (1, 5). Nach GÄUMANN (8) liegt die krankheitsfördernde Wirkung einer einseitigen, hohen Stickstoffdüngung häufig in einer Verweichlichung des Gewebes, dabei setze sie ganz allgemein die Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten herab. Er betont aber ausdrücklich, daß man die Stickstoffwirkung nicht immer isoliert betrachten dürfe, sondern daß häufig der Stickstoff erst in Wechselwirkung mit anderen Faktoren resistenzhemmend, unter Umständen aber auch resistenzfördernd wirken könne. Über eine solche Wechselbeziehung zwischen N-Düngung-Kieselsäureaufnahme und Mehлтаubefall soll nachstehender Versuch berichten.

Verfasser (6) hatte zeigen können, daß im Gefäßversuch bei nicht genügendem Vorrat an pflanzenverfügbarer Kieselsäure im Boden mit steigendem Ertrag auf Grund einer Stickstoff-, Kalk- oder Phosphorsäuredüngung der  $\text{SiO}_2$ -Gehalt von Getreide immer geringer wurde, während der Entzug bis zur Erschöpfung des Bodenvorrates an pflanzenverfügbarer Kieselsäure anstieg, d. h. im Boden keine verfügbare  $\text{SiO}_2$  mehr blieb. Ein bereits dort angeführter Versuch soll in dieser Arbeit im Sinne der hier behandelten Zusammenhänge zwischen Mehлтаubefall und N-Düngung ausgewertet werden.

In diesem Versuch war eine Gefäßreihe mit sieben ansteigenden N-Gaben einer zweiten Reihe gegenübergestellt, die neben der gleichen N-Steigerung mit Kieselsäure gedüngt wurde in Mengen, die den durch die steigende Stickstoffdüngung zu erwartenden niedrigeren  $\text{SiO}_2$ -Gehalt in den Pflanzen ausgleichen sollte.

Versuchsboden war ein Gemisch aus 5 kg Löß (Versuchsfeld Poppelsdorf) und 3 kg Sand (Tannenbusch, Rheinschwemmsand) mit einem pH-Wert (KCl) von 6,5. Als Grunddüngung je Volkgefäß wurden 1,2 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  als  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und dazu 1,6 g  $\text{K}_2\text{O}$  als  $\text{K}_2\text{SO}_4$

gegeben. Die Stickstoffdüngung erfolgte in Gaben von 0,15; 0,30; 0,90; 1,50; 1,80; 2,10 und 2,40 g N als  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Gaben bis 900 mg vor der Saat, Rest nach Bestockung). Die  $\text{SiO}_2$ -Düngung erfolgte in Form von Kieselgel der Fa. Merck (fast reines  $\text{H}_2\text{SiO}_3$  in Stücken), welches im Starmix gemahlen und im Din-Sieb 12 von größeren Bestandteilen befreit worden war. Die Kieselsäuremengen hatten jeweils die 20fache Höhe der Stickstoffgaben, also 3,0 g; 6,0 g; 18,0 g; 30,0 g; 36,0 g; 42,0 g und 48,0 g  $\text{SiO}_2$  je Topf, und wurden beim Ansetzen der Gefäße dem Boden beigemischt. Die Aussaat des Hafers „Flämingsgold“ erfolgte am 13. April 1955, die Ernte am 2. August 1955.

Mit Beginn des Schossens trat auf sämtlichen  $\text{SiO}_2$ -freien, stark mit N gedüngten Gefäßen Mehлтаuf auf. Tabelle 1 zeigt die Stärke des Mehлтаubefalls nach Beendigung der Blüte auf Grund der Bonitierung am 10. 7. 1955. (Wir können uns auf Mitteilung dieser einen Bonitierung beschränken, da die wöchentlich durchgeführten Beobachtungen bis zur Ernte immer das gleiche Bild ergaben.) Die Unterschiede waren vom ersten Auftreten bis zur Ernte so deutlich ausgeprägt, daß man die einzelnen N-Gaben der  $\text{SiO}_2$ -Mangelreihe ohne weiteres am Mehлтаubefall erkennen konnte.

Tabelle 1

Mehлтаubefall von Hafer nach Bonitierung am 10. Juli 1955

$\text{SiO}_2$ -Mangelreihe		$\text{SiO}_2$ -Reihe	
g N je Gefäß	Mehлтаubefall	N-Gabe wie links g $\text{SiO}_2$ je Gefäß	Mehлтаubefall
0,0	0	—	—
0,15	0	3,0	0
0,30	0	6,0	0
0,90	0	18,0	0
1,50	3	30,0	1
1,80	3	36,0	2
2,10	4	42,0	2
2,40	5	48,0	2

0 = kein Befall

5 = stärkster Befall

Aufschluß über die Zusammenhänge zwischen N-Düngung und Mehлтаubefall sollte nun neben der Ertragsfeststellung eine Analyse der Erntesubstanz auf  $\text{SiO}_2$  und N ergeben (Tabelle 2). Durch die Stickstoffdüngung steigen selbstverständlich Korn- und Stroherträge an. Es zeigte sich, daß der außerordentlich starke Mehлтаubefall bei den höchsten N-Gaben der  $\text{SiO}_2$ -Mangelreihe keinerlei Einfluß auf den Strohertrag hatte, sich von der vierten N-Gabe an aber in wesentlich geringeren Kornerträgen bemerkbar machte. Von der vierten bis siebenten Gabe betragen sie immer nur rund 75 % der  $\text{SiO}_2$ -Reihe. Gleichzeitig sinkt der  $\text{SiO}_2$ -Gehalt der Gesamternte bis zur dritten N-Gabe ab und steigt mit der vierten Gabe wieder an, um dann diese Höhe bis zur siebenten N-Gabe beizubehalten. Der Wiederanstieg des  $\text{SiO}_2$ -Gehaltes



Tabelle 2

SiO<sub>2</sub>-Gehalt, SiO<sub>2</sub>-Entzug und N-Gehalt von Hafer nach Düngung mit Stickstoff und Kieselsäure Ertrag in g Tr. M. je Gefäß (Mittel aus drei Parallelen)

Grunddüngung + g je Topf N	g je Topf SiO <sub>2</sub>	Strohertag g	SiO <sub>2</sub> -Geh. Stroh %	N-Geh. Stroh %	Korn-Ertrag g	SiO <sub>2</sub> -Geh. Korn %	N-Geh. Korn %	Ertrag g	Korn + Stroh		N-Geh., %
									SiO <sub>2</sub> -Geh. %	SiO <sub>2</sub> -Ent. g	
0,0	—	16,01 ± 0,36	2,64	0,25	8,62 ± 1,02	1,46	1,33	24,63	2,23	0,55	0,63
0,15	—	22,50 ± 1,23	1,94	0,25	13,99 ± 1,21	1,01	1,33	36,49	1,62	0,59	0,65
0,3	—	28,49 ± 0,32	1,75	0,26	19,21 ± 0,87	0,88	1,42	47,70	1,40	0,67	0,73
0,9	—	41,94 ± 0,64	1,44	0,36	32,82 ± 0,78	0,60	1,73	74,76	1,07	0,80	0,96
1,5	—	47,53 ± 1,76	1,92	0,65	35,08 ± 0,78	0,47	2,18	82,61	1,29	1,07	1,30
1,8	—	50,69 ± 1,66	1,89	0,92	33,84 ± 1,32	0,48	2,35	84,53	1,31	1,11	1,49
2,1	—	50,15 ± 1,09	1,91	1,02	32,09 ± 0,44	0,60	2,58	82,24	1,39	1,15	1,63
2,4	—	51,44 ± 0,58	1,87	1,12	34,45 ± 1,27	0,54	2,52	85,89	1,33	1,14	1,68
0,15	3,0	21,40 ± 1,44	3,87	0,26	12,56 ± 0,44	1,60	1,40	33,96	3,00	1,02	0,68
0,30	6,0	27,15 ± 0,43	3,72	0,25	18,91 ± 0,27	1,69	1,37	46,06	2,84	1,31	0,71
0,90	18,0	42,59 ± 1,03	4,38	0,32	33,43 ± 0,26	1,49	1,55	76,02	3,09	2,35	0,86
1,5	30,0	51,07 ± 0,73	4,67	0,48	41,11 ± 0,59	1,45	2,04	92,18	3,24	2,99	1,17
1,8	36,0	52,49 ± 0,97	5,02	0,62	44,28 ± 0,72	1,29	2,24	96,77	3,30	3,19	1,36
2,1	42,0	50,57 ± 0,72	5,32	0,80	44,13 ± 0,61	1,30	2,44	94,70	3,44	3,26	1,56
2,4	48,0	53,38 ± 0,69	5,32	0,95	43,61 ± 0,91	1,36	2,59	96,99	3,54	3,43	1,68

wird aber nur durch den geringeren Ertrag verursacht, der seinerseits ja durch den Mehлтаubefall bedingt war. Bei einem höheren Ertrag würde sich der  $\text{SiO}_2$ -Gehalt — da ja der Entzug praktisch gleichgeblieben ist — auf eine Höhe eingestellt haben, die etwa so hoch wie die der dritten N-Gabe ist. Danach entspricht also einer hohen N-Gabe mit hohem Ertrag und geringem  $\text{SiO}_2$ -Gehalt ein starker Mehлтаubefall. Andererseits vermag bei gleich hoher N-Gabe eine Kieselsäuregabe den Befall stark zu mindern. Die Wirkung des mehlaufördernden Faktors N wird durch die hemmende Wirkung der  $\text{SiO}_2$ -Düngung aber nicht vollkommen unterdrückt, wie die Töpfe der Kieselsäurereihe mit den drei höchsten N-Gaben zeigen, die trotz hohen  $\text{SiO}_2$ -Gehaltes einen gewissen Mehлтаubefall aufweisen (Tab. 1). Es scheint also so zu sein, daß, wenn ein Boden bei hohem Ertrag durch eine N-Gabe nicht genügend Kieselsäure zur Verfügung stellen kann, die Disposition für den Mehлтаubefall verstärkt wird, ohne daß man hinterher sagen könnte, welcher Anteil an der Krankheit der unmittelbaren und der mittelbaren N-Wirkung zuzuschreiben wäre.

Weiterhin wurden die N-Gehalte in Stroh und Korn bestimmt. Diese zeigen in Übereinstimmung mit dem Krankheitsbild (Tab. 1) im Stroh der befallenen Pflanzen einen höheren N-Gehalt als in den durch eine  $\text{SiO}_2$ -Düngung fast gesund erhaltenen Pflanzen. In weitaus geringerem Maße läßt sich diese Erscheinung auch im Korn erkennen. Auffällig ist, daß die Korn-erträge der vier höchsten N-Gaben der  $\text{SiO}_2$ -Mangelreihe gleich hoch geblieben sind trotz offensichtlich ansteigenden Krankheitsbefalles.

### Zusammenfassung

1. Ein Gefäßversuch zu Hafer mit steigender N-Gabe (mit und ohne eine  $\text{SiO}_2$ -Düngung) zeigte in der Reihe ohne  $\text{SiO}_2$  bei steigender N-Gabe stärkeren Mehлтаubefall, der den Kornertrag herabsetzte, den Strohertrag aber nicht beeinflusste. Zusätzliche  $\text{SiO}_2$ -Düngung dagegen verhinderte das Auftreten des Mehлтаues.
2. Eine Analyse der Ernteprodukte auf Kieselsäure und Stickstoff ergab, daß der  $\text{SiO}_2$ -Gehalt mit steigender N-Gabe absank und der N-Gehalt der befallenen Pflanzen höher war. Es wird daraus geschlossen, daß neben der allgemeinen Verschiebung der Krankheitsdisposition durch die Stickstoffdüngung der geringere  $\text{SiO}_2$ -Gehalt eine Verstärkung des Befalles bewirkt.

### Literaturverzeichnis

1. GERMAR, B., 1934: Über einige Wirkungen der Kieselsäure in Getreidepflanzen, insbesondere auf deren Resistenz gegenüber Mehltau. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 35, 103.

2. STUCH, P., 1926: Beiträge zur Untersuchung der Halmfestigkeit bei Getreidearten unter dem Einfluß der Düngung und sonstiger Einflüsse. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 7, 257.
3. LOWIG, E., 1935: Einfluß der Kalisalze auf die Mehлтаuresistenz von Getreide und Futterpflanzen. Landw. Jb. 81, 273.
4. SCHAFFNIT, R., und A. VOLK, 1937: Forschungen auf dem Gebiet der Pflanzenkrankheiten und der Immunität im Pflanzenreich. Heft 3.
5. WAGNER, F., 1939: Die Bedeutung der Kieselsäure für das Wachstum einiger Kulturpflanzen, ihren Nährstoffhaushalt und ihre Anfälligkeit gegen echte Mehлтаupilze. Diss. Bonn.
6. GROSSE-BRAUCKMANN, E., 1956: Die Kieselsäureaufnahme von Getreide unter dem Einfluß von Stickstoff, Kalk und Phosphorsäure. Landw. Forsch. 9, 196.
7. BRAUN, H., und E. RIEHM, 1953: Krankheiten und Schädlinge der Kulturpflanzen. Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg, 7. Aufl. 51—52.
8. GÄUMANN, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Verlag Birkhäuser, Basel, 497—500.



# Nematoden der Kulturpflanzen Europas

Von Dr. H. GOFFART

1951. 144 Seiten mit 91 Abbildungen. In Ganzleinen DM 18,—

Das Buch stellt eine moderne und umfassende deutschsprachige Veröffentlichung auf dem Gebiet der Nematodenforschung dar. Praxis und Wissenschaft erhalten durch dieses auf Grund jahrzehntelanger Beobachtungen geschaffene Werk eine klare Übersicht über die wichtigsten Arten der Nematoden und die durch sie hervorgerufenen Schäden an den verschiedenen Kulturpflanzen. Ein ausführliches Schrifttumsverzeichnis sowie alphabetische Zusammenstellungen der berücksichtigten Pflanzen und der aufgeführten Nematoden erhöhen die Übersichtlichkeit dieses hervorragend ausgestatteten und mit zahlreichen Zeichnungen und Abbildungen versehenen Werkes.

*„Goffart hat es verstanden, ein Nachschlage- und Bestimmungsbuch zu schaffen, welches alles Überflüssige vermeidet und dafür das Wesentliche klar und eindringlich für Fachkreise zusammenfaßt.“*  
Berichte über die gesamte Biologie

---

## Zuckerrübenbau

Ein Leitfaden für die Praxis

Von Prof. Dr. HANS LÜDECKE

Leiter der Forschungsstelle für Zuckerrübenanbau Holtensen bei Göttingen

1952. 196 Seiten mit 50 Abbildungen. In Ganzleinen DM 12,—

Alle Maßnahmen, die zur Pflege der Zuckerrübe notwendig sind, führt dieses Buch auf. Hier findet der Praktiker die genauen Düngeanweisungen, die Arbeitserleichterungen bei den Feldarbeiten und alles, was bei geringstem Arbeitsaufwand hohe Erträge nach Menge und Güte erzielen läßt: z. B. Sortenwahl, Aussaat, Ernteverfahren, Lagerung, Verwertung, Schädlingsbekämpfung

*„Besonders erfreulich ist es für den Phytopathologen, daß den Krankheiten und Schädlingen der Rübe ein ihrer Bedeutung entsprechendes Kapitel eingeräumt worden ist. Die Stoffgliederung erfolgte übersichtlich in Krankheiten und Schädlinge 1. an der Keimpflanze, 2. am Wurzelkörper und 3. am Rübenblatt. Jeweils untergliedert in Bakterienkrankheiten, Pilzkrankheiten, tierische Schädlinge und Viruskrankheiten, ist ein schnelles Zurechtfinden möglich. Die in letzter Zeit immer weiter um sich greifende Cercospora-Blattfleckenkrankheit und die Vergilbungskrankheit der Rüben erfahren eine eingehende Behandlung.“*

Nachrichtenblatt für den deutschen Pflanzenschutzdienst

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG



# Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von  
PAUL SORAUER

In sechs einzeln käuflichen Bänden herausgegeben von  
Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL† Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK Prof. Dr. H. RICHTER

## II. Band: Die Virus- und bakteriellen Krankheiten

6., neubearbeitete Auflage in 2 Lieferungen

### 1. Lieferung: Viruskrankheiten

Bearbeitet von Ob.Reg.-Rat Dr. E. KÖHLER und Prof. Dr. M. KLINKOWSKI

1954, 786 Seiten mit 326 Abbildungen, Ganzleinen DM 150,—

### 2. Lieferung: Bakterielle Krankheiten

#### Bakteriosen einschließlich Streptomykosen

Bearbeitet von Ob.Reg.-Rat a. D. Dr. C. STAPP, Braunschweig

1956, 575 Seiten mit 179 Abbildungen, Ganzleinen DM 124,—

Die Lieferungen sind einzeln käuflich

Bei Abnahme beider Lieferungen ermäßigt sich der Einzelpreis um 10 %

---

## Krankheiten und Schädlinge der Zierpflanzen und ihre Bekämpfung

Von Ob.Reg.-Rat Dr. H. PAPE

Mitglied der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Vorsteher des Laboratoriums für gärtnerischen Pflanzenbau, Kiel-Kitzeberg

4., neubearbeitete und erweiterte Auflage

1955, 567 Seiten mit 474 Textabbildungen und 4 Farbtafeln. Ganzleinen DM 53,80

Dieses umfassende Werk behandelt den gesamten Pflanzenschutz von Topf- und Schnittblumen, Freilandblumen aller Art, Stauden und Ziergehölzen. Die Bekämpfungsmethoden liegen nicht allein in der Anwendung von chemischen Mitteln, sondern auch in der Verbesserung der Kulturmethoden, wofür praktische Hinweise gegeben werden.

„Papes Buch gehört zum klassischen Bestand nicht nur der deutschen, sondern der internationalen Literatur.“

Angewandte Botanik

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

---

Verlag: Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstr. 44-47, Tel. 61 44 68/69. Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36. Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe vorbehalten. — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10—12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).